



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE*

Discipline ou spécialité : *Agrosystèmes, Ecosystèmes et Environnement*

Présentée et soutenue par *EBRAHIMI Asa*
Le 17 Décembre 2008

Titre : *Contrôle génétique de la qualité des graines chez le tournesol
(Helianthus annuus L.) soumis à la sécheresse*

JURY

Pr. Y. Henry
Pr. G. Charmet
Pr. A. Sarrafi
Dr. P. Maury
Dr. M. Berger

Président
Rapporteur
Co-directeur
Examineur
Invité

Ecole doctorale : *S.E.V.A.B*

Unité de recherche : *Génétique et Amélioration des Plantes*

Directeur(s) de Thèse : *Pr. P. Grieu*

Rapporteurs : *Noms des rapporteurs (s'ils ne font pas partie des membre du jury)*

N° d'ordre:

THESE

présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL

POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

Spécialité: Génétique et Amélioration des Plantes

Ecole doctorale S.E.V.A.B

par

Asa Ebrahimi

Contrôle génétique de la qualité des graines chez le tournesol

(*Helianthus annuus* L.) soumis à la sécheresse

Pr. Y. Henry	CNRS, Paris	Rapporteur
Pr. G. Charmet	INRA, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Pr. P. Grieu	INP/ENSAT, Toulouse	Directeur de thèse
Pr. A. Sarrafi	INP/ENSAT, Toulouse	Directeur de thèse
Dr. P. Maury	INP/ENSAT, Toulouse	Examineur
Dr. M. Berger	EIP, Toulouse	Invité

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT)

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude à mes directeurs de thèse, Monsieur le Professeur A. Sarrafi et Monsieur le Professeur P. Grieu, pour la confiance qu'il m'ont témoigné en me proposant ce sujet, pour leurs précieux conseils et grande disponibilité. Ces quelques années ont été pour moi très enrichissantes, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance, de ma profonde admiration et de ma respectueuse considération. Je tiens également à remercier chaleureusement Monsieur P. Maury, Maître de conférence à l'ENSAT, pour ses précieux conseils et sa grande disponibilité.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Dr M. Berger, qui en m'accueillant dans son équipe, au sein du Laboratoire d'Agro- Physiologie de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan, pour la réalisation d' une partie de ce travail.

J'adresse également un immense merci à Dr A. Nabipour, chargé de recherche au département d'amélioration des plantes oléagineuses à l'Institut de l' Amélioration des Plantes en Iran pour toutes les connaissances qu'il m'a apportées.

Je remercie Monsieur le Professeur Y. Henry de l' Université Paris-Sud et Professeur G. Charmet Directeur de Recherches à l'INRA de Clermont-Ferrand de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus haute considération.

Je voudrais vivement remercier tous les membres du laboratoire SP2 de l'ENSAT pour m'avoir accueillie si chaleureusement. Je garderai un merveilleux souvenir de ces années passées parmi eux. Tout particulièrement, j'adresse un grand merci à Mme Marie-Josée Tavella, M.Philippe Anson ainsi que mes amis qui ont rendu mon quotidien plus agréable au cours de ces quelques années.

Pour finir, j'adresse tout mon amour à mon mari et à mes parents qui m'ont toujours soutenue dans cette aventure. Vous comptez plus que tout pour moi.

Titre: Contrôle génétique de la qualité des graines chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.) soumis à la sécheresse

Résumé: Afin de progresser dans la compréhension des caractères impliqués dans la qualité des graines du tournesol en condition de contrainte hydrique, nous avons réalisé plusieurs expérimentations, sur deux populations de tournesol exprimant diverses sources de variabilité génétique : des lignées recombinantes (RILs) et des mutants.

Dans une première partie, la variabilité génétique pour des paramètres de qualité germinative des graines en conditions normale et de contrainte hydrique a été étudiée chez les RILs. Nous avons détecté 6 QTLs stables dans les deux conditions expérimentales pour les paramètres de germination. Ces QTLs peuvent être utilisés dans les programmes de sélection visant à améliorer la germination du tournesol. Une co-localisation importante sur le groupe de liaison 11 a été détectée pour les temps de référence de la germination. Nous avons noté que tous les allèles favorables viennent de la lignée RHA266. Ce génotype pourrait être utilisé dans les programmes d'hybridations afin d'améliorer la vitesse de germination chez cette espèce.

La deuxième partie consiste en l'étude de la qualité nutritive des graines chez les RILs et leurs parents, cultivées en serre et au champ, et dans des conditions irriguées et de déficit hydrique. Les régions génomiques contrôlant la teneur en l'huile, la composition en acides gras (palmitique, stéarique, oléique et linoléique), la richesse des graines en protéines ainsi que la grosseur des graines ont été identifiées. Nous avons détecté plusieurs co-localisations de QTLs pour les caractères étudiés ; ces QTLs pourraient être utilisés pour la sélection assistée par marqueurs chez le tournesol. Un QTL majeur pour la teneur en acide oléique, sur le groupe de liaison 3, est co-localisé avec les QTLs contrôlant plusieurs caractères de qualité de l'huile.

La troisième partie est consacrée à l'étude des marqueurs moléculaires associés aux paramètres de la qualité des graines chez une population de mutants (M6). Parmi les mutants étudiés, certains présentent un gain génétique significatif par rapport à la lignée originelle pour les différents paramètres de qualité analysés. Nous avons également comparé les marqueurs en commun chez les mutants et les LIRs pour les caractères étudiés.

Mots clés: déficit hydrique, qualité des graines, QTL, tournesol, gain génétique ,germination

Title: Genetic control of seed quality traits in sunflower (*Helianthus annuus*.L) in drought conditions

Abstract

In order to progress in the comprehension of the characters implied in sunflower seed quality under drought condition, we carried out several experiments. Our materials were two populations of sunflower expressing various sources of genetic variability: recombinant inbreeds lines (RILs) and mutants.

Genetic variability of RILs was studied for seed germination traits under normal and drought conditions. Several QTLs controlling the percentage of germination were identified. We detected 6 non-specific QTLs for the two experimental conditions. These QTLs can be used in selection programmes for improving sunflower germination. An important Co-localization on linkage group 11 was detected for the reference times of germination. All favorable alleles come from RHA266 parental line. This genotype could be used in hybridizations programs in order to improve the speed of germination in sunflower.

Seed nutritional quality in RILs and their parents cultivated in greenhouse and field, under well watered and water stressed conditions were also studied. The genomic regions controlling oil content, fatty-acids composition (palmitic, stearic, oleic and linoleic), seed protein content as well as seed size were identified. We also detected several QTLs co-localized for the studied traits; these QTLs could be used in marker assisted selection programs for seed quality in sunflower. A major QTL for oleic acid content, was detected which was overlapped, with some other QTLs controlling several characters of oil quality on linkage group 3.

Finally the molecular markers associated with the seed quality parameters were detected in at a population of mutants (M6). Some mutants present a significant genetic gain compared to the original line for the quality parameters.

Key words: drought, seed quality, QTL, sunflower, genetic gain, germination

Abbreviations:

GG : gain génétique

LA : teneur en acide linoléique

OA : teneur en acide oléique

OC : teneur en huile

P% : teneur en protéines

P1 : Première composante principale

P2 : Deuxième composante principale

PA : teneur en acide palmitique

PC: teneur en protéines

PSG : pourcentage de graines germées

SA : teneur en acide stéarique

SD : densité de la graine

T50%G : temps de 50% de germination

TGW : poids de mille graines

THW : poids de mille coques

TKW : poids de mille amandes

TMG : temps de germination maximum

TSG : temps de début de germination

1. INTRODUCTION 1

1.1.	Le tournesol : production et utilisation	1
1.2.	Effets de la sécheresse sur la qualité des graines et la germination	2
1.3.	Amélioration génétique de la qualité des graines	3
1.4.	Objectif de la thèse	4

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 8

2.1.	Le tournesol	8
2.1.1.	Classification botanique et biologie	8
2.1.2.	La germination des graines	9
2.1.3.	Composition de la graine de tournesol	10
2.1.3.1.	Constituants de la coque	10
2.1.3.2.	Constituants de l'amande	11
2.2.	Amélioration génétique du tournesol et méthodes d'analyse génétique	13
2.2.1.	Marquage moléculaire	15
2.2.1.1.	Marqueurs RFLP	15
2.2.1.2.	Marqueurs de type PCR	15
2.2.2.	Carte génétique	16
2.2.3.	Identification de QTLs	17
2.2.3.1.	Détection de QTL en considérant les marqueurs individuellement	17
2.2.3.2.	Méthodes de cartographie d'intervalle	18
2.2.3.3.	Méthodes multi-marqueurs	18
2.3.	Contrôles génétiques de la germination et de la qualité des graines	19
2.3.1.	Contrôle génétique de la germination	19
2.3.2.	Contrôle génétique de la qualité des graines	19
2.4.	Effets de la sécheresse sur la germination et la qualité des graines	21
2.4.1.	Effets de la sécheresse sur la germination	21
2.4.2.	Effets de la sécheresse sur la qualité des graines	22
2.4.2.1.	Caractéristiques physiques : poids des graines et rapport coque / amande	22
2.4.2.2.	Teneurs en huile et en protéines	22
2.4.2.3.	Composition en acides gras	23

3. MATERIELS ET METHODES 26

3.1.	Matériel végétal	26
3.1.1.	La population des lignées recombinantes (RILs)	26
3.1.2.	La population des mutants (M6)	26
3.2.	Conditions de culture	26
3.2.1.	Conditions de culture pour les LIRs	26
3.2.1.1.	Culture en conditions contrôlées (serre)	26
3.2.1.2.	Culture en conditions naturelles (champ)	27
3.2.2.	Conditions de culture pour les mutants	27
3.2.2.1.	Culture en conditions contrôlées (serre)	27
3.2.2.2.	Culture en conditions naturelles (toit roulant)	28

3.2.3.	Test pour l'évaluation des paramètres de germination	28
3.2.3.1.	Traitement témoin	29
3.2.3.2.	Traitement contrainte hydrique	29
3.3.	Paramètres étudiés	29
3.3.1.	Paramètres de qualité de la graine	29
3.3.2.	Paramètres de qualité de la semence	30
3.4.	Méthodes d'analyse génétique	30
3.4.1.	Variabilité génétique et gain génétique	30
3.4.2.	Détection des QTLs pour les LIR	30
3.4.3.	Identification de marqueurs individuels	31
3.5.	La carte génétique	31
4.	ANALYSE GENETIQUE DE LA GERMINATION SOUS CONTRAINTE HYDRIQUE ET DE LA QUALITE DES GRAINES CHEZ DES LIGNEES RECOMBINANTES DE TOURNESOL SOUMISES A LA SECHERESSE	33
4.1.	Introduction	33
4.2.	Synthèse des résultats et conclusion	103
4.2.1.	Variation phénotypique de la population de LIRs	103
4.2.2.	QTLs associés aux caractères de germination et de qualité de la graine	105
4.2.3.	Comparaison des QTLs des paramètres de germination avec ceux associés à la qualité des graines	108
5.	EVALUATION DE L'EFFET DE MUTATIONS AUX RAYONS GAMMA SUR LA QUALITE DES GRAINES DU TOURNESOL (HELIANTHUS ANNUUS L.) EN CONDITION DE SECHERESSE	111
5.1.	Introduction	111
5.2.	Synthèse des résultats et conclusion	132
5.2.1.	Variabilité génétique des caractères de germination et de la qualité de la graine	132
5.2.2.	Identification de marqueurs moléculaires associés aux caractères étudiés	133
6.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	136
6.1.	Variabilité génétique des caractères germination et de qualité des graines chez le tournesol	136
6.2.	Les régions chromosomiques d'intérêt pour la germination et la qualité de la graine du tournesol	137
6.2.1.	Comparaison des QTLs identifiés avec ceux présentés dans la littérature	138
6.2.2.	QTLs communs à différents paramètres de qualité de la graine	139
6.2.3.	Marqueurs communs aux mutants et RILs pour les caractères étudiés	142
6.3.	Perspectives	142
7.	REFERENCES	% *

1. Introduction

1.1. *Le tournesol : production et utilisation*

Avec une production mondiale oscillant autour de 27 millions de tonnes, et un rendement moyen de l'ordre de 12 q/ha, le tournesol est l'une des grandes espèces oléagineuses de la planète. Les atouts internationaux de l'espèce sont sa richesse en huile, sa résistance à la sécheresse et plus généralement son faible besoin en intrants. En 2007, les principaux pays producteurs ont été l'Union Européenne (15.2 millions de tonnes), la Russie (5.6 millions de tonnes) et l'Argentine (3.5 millions de tonnes). La demande mondiale sur le marché des graines oléagineuses et des huiles est forte. Le tournesol y tient une part essentielle puisqu'il représente 10% de la production des graines et 12% de la production d'huile; la première culture oléo-protéagineuse étant le soja avec plus de 50% de la production mondiale (<http://www.fao.org>). A l'intérieur de l'Union Européenne, la France produit 1.4 millions de tonnes de graines de tournesol ([http://www. faostat.fao.org/](http://www.faostat.fao.org/)). Le rendement moyen en France est le plus élevé de tous les pays grands producteurs de tournesol (25.7 q/ha vs 12.6 en 2007). Dans l'hexagone, 80% de la culture du tournesol se concentre sur cinq régions. Poitou-Charentes et Midi-Pyrénées représentent à elles seules 50% des surfaces cultivées suivies des régions Centre, Pays de Loire et Aquitaine.

Le tournesol est d'abord cultivé pour ses graines, qui représentent l'une des plus importantes sources d'huiles alimentaires au monde. La teneur en huile des graines de tournesol est voisine de 45% (moyenne de la récolte 2007 en France). Plusieurs facteurs expliquent que l'huile de tournesol soit considérée comme une huile de première qualité : Couleur pâle, forte teneur en acides gras non saturés, absence d'acide linolénique et d'acides gras trans, saveur neutre, forte résistance à l'oxydation et point de fumée élevé. Un atout de l'huile de tournesol est la grande diversité de composition en acides gras. Ceci conduit à des utilisations variées aussi bien en nutrition humaine que dans le domaine non alimentaire. Pour le secteur alimentaire, le développement de variétés de tournesol différemment enrichies en acides gras présente un réel intérêt pour l'alimentation humaine, avec de nombreux effets bénéfiques sur la santé. L'huile de tournesol entre dans la fabrication de margarine, de sauces pour salades et de préparations pour nourrissons. Dans le secteur non alimentaire, l'huile de tournesol peut être utilisée dans le domaine des lubrifiants, le domaine des peintures et biosolvants, des produits cosmétiques

ou pharmaceutiques. L'huile de tournesol, comme l'huile de colza, peut être utilisée directement comme agrocarburant dans les moteurs diesel, ou après estérification en ester méthylique. Ces dernières années, l'UE a considérablement augmenté sa production de biocarburants, en particulier de biodiesel, le biocarburant le plus important produit dans l'UE. Le 23 janvier 2008, un « paquet Energie Climat » a été présenté par la Commission européenne aux Etats membres : « faire en sorte que, parmi les carburants utilisés par les transports, les biocarburants soient présents à hauteur de 10% dans la consommation totale des véhicules d'ici 2020, dans chaque Etat membre ».

A partir de la trituration de la graine entière de tournesol, on obtient ce que l'on appelle du tourteau "pailleux". L'amande de la graine de tournesol est en effet protégée par deux demi enveloppes cellulósiques. La suppression partielle de ces enveloppes par décorticage permet d'obtenir un tourteau moins cellulósique et plus riche en protéines. La composition en cellulose et en protéines des tourteaux de tournesol est très variable, conséquence de la variabilité des origines des graines, de la variété et de la technologie de décorticage. Ainsi, pour le tourteau de type "pailleux", la teneur en protéines varie de 21 à 40 % et la teneur en cellulose de 16 à 34 %. Par rapport aux autres tourteaux, le tourteau de tournesol présente l'avantage de ne contenir aucun facteur anti-nutritionnel pouvant limiter son incorporation dans les aliments ou son acceptabilité par les animaux (Cetiom Octobre 2003 Fiche Technique). La teneur en protéines de la graine de tournesol est un critère d'intérêt pour la valorisation de la graine suite à l'extraction de l'huile.

Les teneurs en huile et en protéines ainsi que la composition en acides gras (palmitique, stéarique, oléique et linoléique) sont des critères déterminants pour la valorisation de la production. Ces critères de qualité de la graine sont largement influencés par les interactions entre la variété, le milieu et les conditions de cultures.

1.2. Effets de la sécheresse sur la qualité des graines et la germination

Le tournesol est cultivé le plus souvent dans des milieux où la ressource en eau est très variable et souvent déficitaire dès la floraison. Cette culture a en effet l'avantage de mieux valoriser l'eau que les autres cultures d'été plus gourmandes en ressources hydriques au moment des grosses chaleurs. En effet, le tournesol présente un système racinaire profond, une forte plasticité du développement foliaire et une capacité photosynthétique élevée (intermédiaire entre les plantes en C3 et les plantes en C4). En dépit de son bon

comportement face à la sécheresse, il subsiste une importante fluctuation inter-annuelle du rendement et de la teneur en huile. Par exemple, le déficit hydrique fortement marqué en 2003 a conduit à une diminution du rendement de 3.7 q/ha par rapport à 2002 sur le plan national (20,3q/ha en moyenne en 2003). La teneur en huile ainsi que la composition de l'huile sont également affectées par la sécheresse, avec une diminution des teneurs en acide linoléique et une augmentation du taux d'acide oléique (Roche et al. 2006). Le déficit hydrique associé aux fortes températures durant le remplissage des graines a affecté fortement la lipidogénèse, avec en particulier une inhibition de l'activité enzymatique responsable de la transformation de l'acide oléique en acide linoléique. Il convient donc de réfléchir aux voies d'amélioration de la productivité du tournesol, en particulier en terme de qualité de la récolte, dans le cadre de contraintes hydriques plus ou moins marquées.

Au champ, les processus qui conditionnent les premières étapes du développement de la culture (émergence de la plantule et développement des premières feuilles) peuvent être également fortement affectés par l'état hydrique du sol. La germination des graines nécessite un potentiel hydrique du sol supérieur à -2MPa (Roberts et Hills 1989). La quantité d'eau nécessaire à la réhydratation des tissus lors de la germination est de 50% à 250% du poids sec de la graine. Les graines oléagineuses ont cependant besoin de moins d'eau par rapport aux graines amylacées et protéagineuses. L'amélioration de la productivité du tournesol dans des milieux fortement affectés par la sécheresse dès le début du cycle cultural pourrait s'appuyer également sur la recherche de génotypes présentant une forte aptitude à la germination sous contrainte hydrique.

.

1.3. Amélioration génétique de la qualité des graines

Les processus qui participent à la réponse intégrée de la plante en terme de qualité par la composition de la graine sont complexes et leurs déterminismes au niveau génétique sont peu étudiés. Depuis longtemps, les méthodes classiques de la sélection ont contribué à améliorer la teneur en huile des akènes de tournesol (Skoric, 1988). Les croisements réalisés en URSS ont permis d'augmenter la teneur en huile de 30% (20 à 50%) (Fick, 1975). Le pourcentage d'huile varie selon la proportion de l'amande (pouvant aller de 40 à 70%) et selon la proportion relative d'huile contenue dans l'amande (48 à 78%) (Leon *et al.*, 1995). Cette

variabilité est principalement d'origine génotypique (Vancreau, 1977). Outre la sélection génétique traditionnelle ayant contribué à améliorer les seuils de composition naturels, les techniques de mutagenèse physico-chimique développées dès les années 70 ont conduit à la création de mutants présentant des teneurs modifiées en acides gras. La population de tournesol « Pervenets » (Soldatov, 1976), issue de mutagenèse chimique, a permis de développer des génotypes présentant une teneur élevée en acide oléique (80% vs 14 à 39%) dans les graines alors que les variétés « classiques ou standards » présentent une majorité d'acide linoléique (Morin, 2003). D'autres mutants ont par la suite été développés, comme le mutant « M-4229 » par Vick et Miller (1996) avec une forte teneur en acide oléique (86%), le mutant « 2698-1 » par Miller et Vick (2001) avec une forte teneur en acide linoléique (78%), CAS 12 (Fernandez-Martinez *et al.*, 1997) avec une forte teneur en acide palmitique (31%) et CAS 14 (Fernandez-Moya *et al.*, 2002) avec une forte teneur en acide stéarique (37%). De manière générale, l'analyse des bases génétiques des critères de qualité de la graine de tournesol apparaît déterminante pour la sélection de génotypes d'intérêt et pour mieux maîtriser les interactions génotypes × environnements dans les systèmes de cultures.

1.4. Objectif de la thèse

Plante économe en intrants et adaptée aux situations de fortes chaleurs, aux débouchés nationaux et internationaux garantis, le tournesol doit impérativement améliorer ses performances agronomiques pour rester compétitif sur les exploitations agricoles françaises. Depuis juin 2004, l'INRA, l'ENSAT, l'ESAP, le CETIOM, les sélectionneurs privés, 'ASEDIS-SO, SOFIPROTEOL et la région Midi-Pyrénées ont décidé d'unir leurs moyens autour d'un projet commun: Tournesol 2010. Il s'agit de renforcer les moyens consacrés à la recherche chez le tournesol, de façon à améliorer sa compétitivité globale dans les cinq à dix ans à venir. Tournesol 2010 est un projet de recherche touchant à l'agronomie, la génétique, l'écophysiologie et la pathologie, associant les acteurs de la recherche publique et privée. Différentes stratégies agronomiques et génétiques ont été envisagées dans ce projet pour améliorer la productivité. L'amélioration de la productivité du tournesol repose sur deux approches complémentaires : l'optimisation de la conduite culturale d'une variété d'intérêt et la sélection de génotypes présentant des caractéristiques remarquables. Les biotechnologies, notamment le marquage moléculaire, sont des outils désormais incontournables dans les programmes de sélection. Les marqueurs moléculaires permettent d'affiner la connaissance de

la génétique classique par l'établissement de cartes génétiques dans lesquelles sont localisés les QTL (Quantitative Trait Loci) impliqués dans le contrôle de caractères quantitatifs, comme la qualité des graines. Ces QTL sont ensuite repris dans les programmes de Sélection Assistée par Marqueurs (SAM) car ils permettent une sélection mieux contrôlée et précoce.

La sélection du tournesol a fourni des variétés résistantes aux principaux pathogènes (mildiou, phomopsis) tout en progressant sur la productivité et de manière moins nette sur la teneur en huile (Vear et al. 2003). Par contre, les variétés n'ont pas été sélectionnées sur leur tolérance aux contraintes abiotiques. Une analyse génétique de caractères associés à la productivité du tournesol sous contrainte hydrique a été récemment développée dans le cadre de la thèse de Poormohammad Kiani (2007). Le travail a permis d'identifier des QTLs contrôlant des caractères impliqués dans la tolérance de la plante à la sécheresse (régulation de la transpiration, ajustement de l'état hydrique au niveau foliaire, ...). Une analyse plus intégrative de l'impact de la sécheresse sur la productivité du tournesol, nécessite d'étudier le contrôle génétique de caractères associés à la qualité de la graine (teneur en huile et composition en acides gras). Dans cette perspective d'amélioration de la productivité du tournesol en conditions sèches, il apparaît également important d'analyser le contrôle génétique du processus de germination dans différentes situations hydriques, la germination de la graine étant fortement affectée par l'état hydrique du milieu.

Dans ce cadre, mon travail de thèse porte sur une analyse génétique de caractères contrôlant la qualité de la graine du tournesol, ainsi que la germination, dans des conditions de contraintes hydriques. Une première étape a été de caractériser la variabilité génétique de deux populations de tournesol (lignées recombinantes et mutants) pour les différents caractères étudiés, pour ensuite analyser le déterminisme génétique de ces caractères, et enfin dans une dernière étape, identifier les zones génomiques impliquées dans le contrôle des caractères et proposer des marqueurs moléculaires d'intérêt pour la sélection de génotypes innovants.

Le mémoire de thèse sera présenté sous forme de 5 chapitres :

- le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique relative au tournesol, à la germination et à la composition de la graine en réponse à la sécheresse ainsi qu'à l'amélioration génétique de la qualité des graines.

- le deuxième chapitre présente les matériels et les méthodes utilisés.
- le troisième chapitre présente une analyse génétique de la germination et de la qualité des graines chez des lignées recombinantes de tournesol soumises à une contrainte hydrique.
- le quatrième chapitre est consacré à une étude génétique de la germination et de la qualité des graines chez des mutants du tournesol soumis à la sécheresse.
- Enfin le mémoire se conclura en proposant des perspectives à ce travail.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2. Etude Bibliographique

2.1. *Le tournesol*

2.1.1. Classification botanique et biologie

Le tournesol (*Helianthus annuus* L.) est une espèce diploïde ($2n=2x= 34$) originaire d'Amérique du Nord. Il a été ramené en Europe au XVI^e siècle par les Espagnols (Soltner1995). Le genre *Helianthus* renferme 49 espèces, réparties en 4 sections: nommées *Divaricati* (31 espèces), *Helianthus* (11 espèces), *Ciliares* (6 espèces) et *Agrestes* (1 espèces) (Schilling et Heiser, 1981). Selon les données archéologiques, il semble que cette plante ait été domestiquée dans la partie centrale des États-Unis. Le genre compte des espèces annuelles et vivaces, et il y a polyploïdie dans ce dernier groupe.

L'espèce cultivée, *H. annuus*, telle que décrite par Seiler (1997) est pour l'essentiel une plante de forte taille, mais des génotypes dont la taille varie de 50 à 500 cm ont aussi été mises au point. Les tiges sont normalement non ramifiées (simples) et, comme la plupart des autres parties de la plante, elles peuvent varier de glabres à très pubescentes. Les premières feuilles sont toujours opposées mais, chez certaines variétés, les suivantes deviennent alternes. Les feuilles sont habituellement pétiolées et trinervées; leur forme varie de linéaire à ovée, et elles sont généralement entières ou dentelées. L'intensité de la couleur peut varier de vert pâle à vert foncé. L'inflorescence est un capitule, ce qui est une caractéristique de la famille des Composées. Celui-ci comprend de 50 à 3000 fleurs, mais ce chiffre pourrait être plus élevé chez les cultivars non oléagineux. Les fleurs tubulées situées le plus près du pourtour du disque s'ouvrent les premières, à peu près en même temps que les fleurs ligulées, qui sont d'abord repliées contre les bourgeons des fleurs tubuleuses. Des cercles successifs comprenant de un à quatre rangs de fleurs tubulées s'ouvrent chaque jour pour une période de 5 jours ou plus. L'orientation du capitule est variable. Il en va de même de sa forme, qui peut être concave, convexe ou plate. L'akène, ou fruit du tournesol, se compose d'une graine, parfois appelée amande, et d'un péricarpe non adhérent, aussi appelé coque ou écale. À défaut de fécondation, les akènes demeurent vides, sans graine. Leur taille peut varier, la longueur allant de 7 à 25 mm et la largeur, de 4 à 13 mm. Quant à leur forme, elle peut être linéaire, ovale ou presque ronde. Le tournesol est une plante annuelle qui ne se propage que par la graine et qui

peut s'hybrider spontanément avec plusieurs espèces sauvages/envahissantes apparentées (Burke et al. 2002). Avant les années 1960, les cultivars utilisés étaient allogames, et leur pollinisation était assurée essentiellement par les insectes. Tout comme les espèces sauvages, ils étaient fortement auto-incompatibles. Les variétés commerciales actuelles de tournesol sont autocompatibles, mais les conditions environnementales peuvent influencer sur le degré d'autofertilité exprimé (Snow et al. 1998).

La graine de tournesol est en réalité un akène, fruit sec indéhiscent situé dans l'inflorescence appelée capitule. L'akène est constitué d'un embryon recouvert d'un tégument séminale constituant l'amande, et d'un péricarpe non soudé dérivé de la paroi de l'ovaire sec et indéhiscent correspondant à l'enveloppe de l'akène (ou coque). Dans ce mémoire, le terme «graine» a été retenu pour décrire l'akène de tournesol dans la mesure où celui-ci est communément utilisé en sciences agronomiques et aussi par les producteurs au même titre que le terme « semence », et il correspond à la graine entière. La graine présente dans un premier temps une phase de formation de l'embryon (division cellulaire ou embryogenèse puis expansion cellulaire ou morphogenèse). Cette phase est suivie d'une période de maturation correspondant à l'accumulation des réserves dans l'albumen. Elle s'accompagne d'une forte augmentation du volume des cellules et d'un pic de teneur en acide abscissique. Une dernière phase de déshydratation aboutit à la maturité physiologique (Côme et Corbineau, 1998). D'un point de vue agronomique, le développement de l'akène se décompose en 2 phases correspondant à la formation de la coque et de l'amande. Elle débute par la croissance de la coque; à l'anthèse, le péricarpe pèse environ 2 mg (Connor et Hall, 1997). L'amande entame sa croissance rapidement, environ 8 jours après l'anthèse et gagne 33% de son poids final quand la constitution de la coque s'achève (Villalobos et al. 1996). En raison du décalage du développement de l'amande et de la coque dans le temps, un stress survenant pendant leur période de formation peut altérer le ratio coque/amande de chaque akène (Connor et Hall, 1997).

2.1.2. La germination des graines

La germination des graines est déterminée par des composantes génétiques et environnementales (Hodgkin et Hearty, 1978). Le seuil de température pour la germination de la graine chez le tournesol est de 4°C, mais une température d'au moins 8 à 10°C est

nécessaire pour une bonne germination au semis du tournesol au champ. Pendant la première phase, les graines sont sèches et ont des potentiels hydriques généralement compris entre -350 et -50 MPa (Robert et Ellis, 1989). Elles absorbent rapidement l'eau quand elles sont placées en contact avec de l'eau libre. Cette imbibition est un processus purement physique qui se produit également avec des graines vivantes ou mortes (Hegarty, 1978). Pendant la seconde phase, la majorité des événements métaboliques sont initiés à l'intérieur de la graine dans le but de faire croître la radicule. Cette période peut être considérée comme la période de germination qui se termine par le commencement de la phase de croissance (Bewley et Black, 1978). La prise d'eau augmente brusquement durant la troisième phase qui est concourante avec l'élongation de la radicule (Bewley et Black, 1994). Sous contrainte hydrique, la vitesse d'imbibition est réduite ainsi que la teneur en eau finale de la graine pendant la première phase; la durée de la deuxième phase est prolongée et l'entrée dans la troisième phase est retardée (Bradford, 1986). La teneur en protéines de la graine a une influence significative sur la vitesse de germination et la vigueur des plantules. Au cours de la germination, les protéines de réserve synthétisées pendant la maturation des graines sont dégradées en petits peptides et en acides aminés qui sont en suite utilisés pour la croissance de la plantule (Preston et Kruger, 1986 ; Wilson, 1986). Au moment de la germination puis en cours de l'implantation, des protéases nouvellement synthétisées, principalement des endopeptidases, sont importées dans les corps protéiques de l'albumen ou des cotylédons (via le système sécrétoire) et débutent l'hydrolyse des protéines de réserves. Celles-ci deviennent alors sensibles à d'autres protéases déjà présentes ou nouvellement importées (endopeptidases et carboxypeptidases) qui les dégradent. Les lipides de réserves, composés s'accumulant majoritairement dans l'akène de tournesol, constituent une réserve d'énergie et une source de carbone nécessaire à l'embryon pour son développement.

2.1.3. Composition de la graine de tournesol

2.1.3.1. Constituants de la coque

La coque est formée de fibres de cellulose et de lignine (50 à 73% de la matière sèche) et d'hémicellulose (20%), et représente entre 20 (hybrides modernes) et 40% (graines de bouche) de la biomasse totale de la graine (Connor et Hall, 1997). De larges différences de composition en constituants de la coque sont rapportées dans la littérature et portent

essentiellement sur la teneur en lipides (0.9 à 7.1% de la matière sèche), en protéines (2.8 à 7.1 %), en lignines plus cellulose (50 à 68%), hémicellulose (20 à 21%) (Bau et al. 1983; Berot et Briffaud, 1983), et peuvent être attribuées soit à la présence en plus ou moins grande quantité du tégument riche en huile, localisée entre la coque et l'amande; soit au mode de stockage de la graine car la coque a tendance à absorber de l'huile (Laisney, 1984). Les protéines de la coque sont présentes en faible quantité, ce qui réduit le pouvoir nutritionnel du tourteau utilisé en alimentation animale.

2.1.3.2. Constituants de l'amande

L'amande est le lieu de stockage des réserves de la graine nécessaires au développement de l'embryon. La graine de tournesol accumule essentiellement deux types de substances de réserves, les protéines et les lipides, représentant respectivement environ 20 et 50% de la matière sèche de la graine. Le restant revient aux carbohydrates et minéraux (14%) et à la cellulose (15%). Ces valeurs, varient selon le génotype et les conditions de culture.

La fraction protéique est la première composante à s'accumuler dans les akènes de tournesol en formation. Dès le 10^{ième} jour après la floraison, la synthèse des protéines débute et se stabilise à partir du 22^{ième} jour (This et al. 1988). La synthèse des lipides est initiée seulement quelques jours après le début d'accumulation de matière sèche des graines (Merrien, 1992) et se poursuit activement pendant 4 à 5 semaines après la floraison (Goffner et al. 1988) pour atteindre une teneur maximale en fin de cycle, juste avant la maturité physiologique (Harris et al. 1978). Les protéines des graines sont synthétisées à partir de la remobilisation de l'azote foliaire (Steer et al. 1984) et des tiges (Blanchet, 1989). Cette remobilisation (sous forme de protéines solubles) serait d'autant plus forte et précoce que l'intensité lumineuse décroît (Merrien et al. 1983). En situation de contrainte hydrique sévère, la synthèse de l'huile se fait à partir de saccharose néoformé dans les feuilles (Chenesseau et al. 1984), et des composés glucidiques des tiges et des feuilles. Le transport des assimilats se fait préférentiellement sous la forme de saccharose (Yoneyama et al. 1980). Ces assimilats glucidiques sont métabolisés en acides organiques à tous les niveaux de la plante, ou en acides aminés spécifiques du lieu de leur accumulation. Selon Blanchet et al. (1990), plus les feuilles sont actives longtemps, plus la lipidogénèse est favorisée. Ceci vient du fait que la biosynthèse de l'huile requière trois fois plus d'énergie que la synthèse des glucides. Le remplissage des

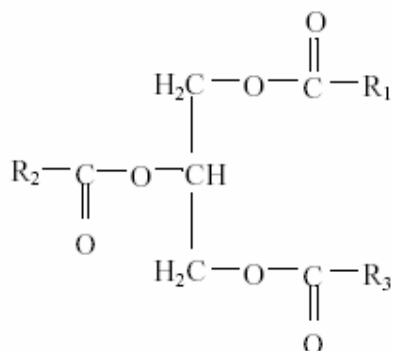
graines, et notamment l'accumulation des lipides est largement conditionné par l'assimilation intervenant en phase post-florale (Blanchet et al. 1982a).

Les protéines de réserve dans la graine mature de tournesol se composent de globulines (55-60%), d'albumines (17-23%), de gluténines (11-17%) et de prolamines (1-4%) (Bauchot et Merrien, 1988). La fraction globuline, plus généralement appelée hélianthinine chez le tournesol, appartient à la famille des protéines de type 12S et constitue la fraction majoritaire. Les fractions albumine (protéines 2S) et globuline sont appelées « protéines solubles ». Elles représentent environ 70% des protéines de la graine de tournesol. Outre les protéines de réserve, les graines de tournesol contiennent d'autres protéines dont le rôle est lié aux mécanismes de défense. Elles sont peu connues à l'exception des oléosines. Ces dernières constituent une famille de protéines de faible poids moléculaire (15 à 26 KDa, Slack et al. 1980) et localisées à la surface des globules lipidiques des graines et peuvent représenter 10 à 20% des protéines totales (Guégen, 1998). Elles sont présentes sous différents isoformes (Tzen et al. 1990) et leur activité pourrait être régulée par des hormones, telles que l'acide abscissique (Hatzopoulos et al. 1990). Leur rôle s'avère plus essentiel dans le catabolisme des réserves lipidiques que l'anabolisme car celles-ci constituent le site de fixation des lipases lors de la germination de la graine (Vance et Huang, 1988). La seule fonction biologique connue des protéines de réserve de la graine est de fournir des acides aminés à la jeune plantule lors de la germination. D'où leur synthèse et leur accumulation en quantités très élevées au cours de la maturation (elles représentent à maturité jusqu'à 80% de l'ensemble des protéines du grain) et leur dégradation s'effectue lors des premiers stades de la germination.

Les lipides sont synthétisés dans la graine à partir du saccharose provenant du transfert d'assimilats des feuilles vers les graines. Le saccharose est converti en trois acides gras précurseurs, l'acide palmitique (C16:0), l'acide stéarique (C18:0) et l'acide oléique (C18:1), par les enzymes de la voie des pentoses phosphates, de la glycolyse et de la biosynthèse des triglycérides localisés dans le cytosol et les proplastes. A partir des proplastes, ces précurseurs sont transférés dans le réticulum endoplasmique, où ils subissent des modifications avant d'être enfermés dans des vésicules formées à partir de la membrane du réticulum endoplasmique et appelées oléosomes (ou corps gras). À l'image des autres huiles végétales, l'huile de tournesol se compose essentiellement de triglycérides et de composés appelés composés mineurs car ils représentent moins de 1 % de l'huile raffinée. Les composés mineurs de l'huile de tournesol, de natures très diverses, comprennent notamment de grandes quantités

de tocophérols (environ 73 mg pour 100 gr d'huile).

Les triacylglycérols sont constitués d'un glycérol estérifié par trois chaînes d'acides gras (Figure 1).



R désigne une chaîne carbonée d'acide gras

Figure 1 : Structure simplifiée d'un triglycéride

Les chaînes acyl d'acides gras liées au groupement glycérol sont saturées, mono ou poly insaturées. Dans les cellules eucaryotes, ces chaînes ne sont pas ramifiées et contiennent un nombre pair de carbones compris entre 6 et 24. Les acides gras majoritaires de la plupart des espèces oléagineuses cultivées (à l'exception du coprah) possèdent 16 à 18 carbones. La chaîne aliphatique peut contenir une ou plusieurs insaturations (doubles liaisons) qui sont majoritairement en configuration *cis* et généralement en position 6, 9, 12 ou 15 (par rapport au carbone 1 portant la fonction carboxylique), et dans le cas des chaînes di- et poly-insaturées, il y a répétition successive du motif CH=CH-CH₂. La nomenclature actuelle permet de connaître le nombre de carbone et d'insaturations (par exemple l'acide oléique est noté C18:1 car il possède 18 carbones et une insaturation). La composition relative en acides gras de l'huile de tournesol varie d'un cultivar à l'autre. Globalement, l'huile de tournesol se compose d'environ 90% d'acides gras insaturés (acides oléique et linoléique) et 10 % d'acides gras saturés (acides palmitique et stéarique).

2.2. Amélioration génétique du tournesol et méthodes d'analyse génétique

Les premiers travaux d'amélioration génétique faisaient appel à la sélection massale ou

phénotypique, qui consiste à sélectionner les plantes en fonction de caractères donnés. Comme le tournesol est fortement allogame, il n'y avait pas de contrôle de la pollinisation. Diverses variétés sélectionnées en fonction de caractères tels que la résistance aux maladies, la teneur en huile et certaines caractéristiques des graines ont été créées de cette façon. En URSS, Pustovoit (1964) a mis au point une technique beaucoup plus efficace. Elle consiste à prélever des graines de divers capitules et de les évaluer à l'égard de divers caractères dans une pépinière pendant deux ans, les capitules sélectionnés étant par la suite pollinisés de façon contrôlée. C'est ainsi qu'on est parvenu à accroître de façon spectaculaire la teneur en huile du tournesol, tout en améliorant son rendement.

L'autofécondations successives et l'obtention des lignées homozygotes a été utilisée pour améliorer le tournesol dès 1922. Ce n'est qu'au cours des décennies 1940 et 1950 que les premiers hybrides F1 ont fait l'objet d'une culture commerciale au Canada. La découverte de la stérilité mâle cytoplasmique par Leclercq (1969), en France, suivie de l'identification de gènes restaurateurs de la fertilité, a permis de tirer pleinement partie de l'effet d'hétérosis. Les progrès issus de la sélection d'hybrides ont permis de doubler la production mondiale du tournesol en seulement 20 ans. L'accent a été mis sur la sélection pour la résistance aux maladies responsables d'importantes pertes de rendement (phomopsis, sclérotinia, mildiou, orobanche et Phoma) et a conduit à la création d'hybrides de plus en plus résistants (Leclercq 1970; Skoric 1985; Vear et Tourveille de Labrouhe 1988). La connaissance simultanée de la variabilité moléculaire d'un allèle et de la variabilité de son effet sur un caractère phénotypique permet de concevoir la sélection assistée par marqueurs (SAM). En effet, la construction de génotypes cumulant des formes alléliques favorables pour plusieurs locus et plusieurs caractères devient possible avec le simple recours au marquage moléculaire.

Le cas le plus simple d'utilisation de la SAM concerne l'amélioration d'un génotype par le transfert d'un caractère présent dans un autre génotype et gouverné par un seul gène. Ce transfert peut être accéléré si l'on dispose d'un marqueur moléculaire du gène et de marqueurs répartis sur le génome du génotype à améliorer. Ces marqueurs moléculaires permettent de choisir, à chaque génération de rétrocroisement, les descendants se rapprochant le plus du génotype originel, tout en s'assurant de la présence du caractère introduit. Plus complexe est le cas des caractères quantitatifs tels que le rendement qui sont généralement gouvernés par plusieurs locus (Quantitative Trait Loci ou QTL). Le sélectionneur devra, en conséquence,

accumuler les allèles favorables des ces différents loci. C'est là que la SAM offre le plus d'intérêt par la simplification qu'elle peut apporter face à la complexité de telles situations. Donc le développement des marqueurs moléculaires durant les dernières années offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection.

2.2.1. Marquage moléculaire

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Un bon marqueur doit être à hérédité simple, multi-allélique et co-dominant. Les marqueurs moléculaires correspondent donc au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. L'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines, et est indépendante des conditions de l'environnement. De nombreuses techniques de marquage moléculaire sont aujourd'hui disponibles, et de nouvelles sont régulièrement publiées (Gupta et al. 2001 ; Langridge et al. 2001 ; Rafalski, 2002a, b).

Les caractéristiques de chacune de ces techniques, ses domaines d'applications, son principe et son coût sont largement détaillés dans plusieurs articles de synthèse (Gupta et al. 1999 ; Santoni et al. 2000 ; Langridge et al. 2001). Ces méthodes peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les marqueurs de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les marqueurs basés sur la méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction). Le choix du système de marquage dépend de l'objectif précis fixé, des moyens et des compétences disponibles au laboratoire.

2.2.1.1. Marqueurs RFLP

La technique RFLP développée par Botstein et al. (1980) repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction. Bien que cette technique soit co-dominante et permette une analyse génétique complète, elle est lente et laborieuse. Les étapes de transfert et d'hybridation empêchent une automatisation du travail.

2.2.1.2. Marqueurs de type PCR

Le développement de la technique PCR offre l'avantage d'analyser les marqueurs moléculaires en un temps court tout en utilisant des concentrations faibles d'ADN. Les marqueurs basés sur la technique PCR tendent à remplacer les systèmes classiques (les marqueurs morphologiques, iso-enzymatiques et RFLP) et deviennent très nombreux. Les plus largement utilisés chez le tournesol sont les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat) ; l'AFLP, (Amplified Fragment Length Polymorphism) et la RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé une population de mutants génotypés à l'aide de marqueurs AFLP, ainsi qu'une population de lignées recombinantes de tournesol cartographiées à l'aide de marqueur AFLP et SSR (Poormohammad Kiani et al. 2007) .

2.2.2. Carte génétique

La construction de cartes génétiques permet une meilleure localisation des zones chromosomiques d'intérêt grâce à l'identification des marqueurs flanquants (Knapp et al. 1990). Chez le tournesol, la première carte génétique a été établie en se basant sur des marqueurs RFLP (Gentzbittel et al. 1995). Cette carte a été utilisée dans la cartographie du locus P11 conférant la résistance à la race 1 de *Plasmopara halstedii* et la résistance au *Sclerotinia sclerotiorum* chez le tournesol (Metries et al. 1998). Deux autres cartes de RFLP ont aussi été publiées chez le tournesol (Berry et al. 1995; Jan et al. 1998). Les marqueurs AFLP ont été utilisés dans la cartographie de plusieurs espèces végétales comme le riz (Mackill et al. 1996), le maïs (Castiglioni et al. 1999), la tomate (Haanstra et al. 1999), le melon (Wang et al. 1997), la laitue (Jeuken et al. 2001) et le tournesol (Flores Berrios et al. 2000; Al-Chaarani et al. 2002) ainsi que dans des études de résistance aux maladies virales, comme la mosaïque du concombre (Ben-Chaim et al. 2001). Chez le tournesol, la carte génétique basée sur les marqueurs AFLP, en utilisant des lignées recombinantes, a permis d'identifier des QTLs liés à l'organogénèse (Flores Berrios et al. 2000a). Une carte génétique a été construite à l'aide de 273 marqueurs SNP chez le tournesol (Lai et al. 2005), en utilisant la même population de lignées recombinantes qui a été déjà utilisé par Tang et al. (2002) pour la construction d'une carte à base de marqueurs SSR. En 2007 une carte génétique basée sur 191 SSRs et 304 AFLPs a été développée au sein du notre laboratoire (Poormohammad Kiani et al. 2007). Cette nouvelle carte génétique est un outil génétique de base important pour l'analyse de caractères quantitatifs et qualitatifs chez le tournesol. Mon travail de thèse

s'appuie sur l'utilisation de cette carte génétique pour l'identification de QTLs de caractères associés à la qualité de la graine chez le tournesol.

2.2.3. Identification de QTLs

La détection de QTLs impliqués dans le contrôle d'un caractère donné repose sur :

- Le choix de parents présentant du polymorphisme afin d'obtenir une descendance en ségrégation.
- La détermination du génotype de chaque descendant (génotypage)
- La mesure de la valeur du caractère quantitatif recherché pour chaque individu, famille ou lignée étudiée (phénotypage)
- L'utilisation d'une méthode biométrique afin de corréler les locus marqueurs au caractère étudié.

Il existe 3 catégories de méthodes biométriques utilisées pour détecter des QTLs, selon que l'on analyse les marqueurs individuellement, deux par deux ou par groupe.

2.2.3.1. Détection de QTL en considérant les marqueurs individuellement

Cette méthode de détection est basée sur la comparaison des moyennes aux différents locus, pour chaque génotype. Nous pouvons utiliser l'une des méthodes d'analyse suivantes:

Test « t » de student

Il peut être utilisé chez les populations pour lesquelles il n'existe que deux classes de marqueurs comme le backcross (F1× parent récessif), les lignées haploïdes doublées (DH) et les lignées recombinantes (RILs) (Markel et al. 1996).

Analyse de variance

On considère qu'il existe un QTL lié au marqueur si le test F (σ^2 intra / σ^2 inter) est

significatif. Cette méthode peut être utilisée dans les populations F2 présentant trois génotypes pour le marqueur : MM, Mm et mm (marqueurs co-dominants).

Méthode du maximum de vraisemblance

La méthode du maximum de vraisemblance permet l'estimation des effets directs du QTL et du taux de recombinaison. Cette approche est moins puissante que l'analyse de variance surtout lorsque le QTL est très proche du marqueur. La vraisemblance est fonction de la probabilité de disposer d'un génotype QTL et d'avoir une valeur phénotypique associée à ce génotype QTL (Lander et Botstein, 1989).

Ce type d'analyse est simplifié grâce à l'utilisation de logiciels statistiques. L'ordre des gènes ainsi qu'une carte génétique complète ne sont pas nécessaires. Cependant, la carte permet de mieux présenter les résultats (Liu, 1998). Par contre, si la densité de marqueurs est faible, cette méthode est peu efficace pour l'estimation de la position et des effets des QTLs (De Vienne et Causse, 1998).

2.2.3.2. Méthodes de cartographie d'intervalle

Les méthodes de cartographie d'intervalle partent de l'hypothèse qu'il existe un QTL ou plus dans l'intervalle entre deux marqueurs liés par un taux de recombinaison « r » (De Vienne et Causse, 1998). Trois méthodes ont été décrites: des méthodes linéaires basées sur les moyennes au marqueur, la cartographie d'intervalle par maximum de vraisemblance (SIM Simple Interval Mapping) (Lander et Botstein, 1989) et la cartographie d'intervalle par régression multiple (Haley et Knott, 1992).

Dans ces méthodes, le nombre de QTLs et leurs positions ne sont pas toujours bien résolus et les positions exactes des QTL sont difficiles à déterminer. De même, l'outil statistique est relativement peu puissant. Par ailleurs un seul pic peut être identifié lorsque deux QTLs sont très proches l'un de l'autre. Le pic, dans ce cas, va être faible et très large. De même, lorsque les QTLs liés présentent des effets répulsifs, le pic sera soit bas, soit complètement éliminé (Liu, 1998).

2.2.3.3. Méthodes multi-marqueurs

Les méthodes par marqueurs multiples tentent de résoudre les difficultés provenant de la présence éventuelle de plusieurs QTLs liés sur un chromosome ou de réduire le bruit de fond généré par les QTLs ne ségrégant pas aux marqueurs. Kearsey et Hyne (1994) ont proposé une approche basée sur la régression linéaire. Dans cette méthode, la position la plus probable du QTL est celle où la résiduelle du modèle de régression est la plus faible. Cette méthode est simple, cependant, elle ne peut être utilisée avec des marqueurs dominants en F2. La cartographie par composition d'intervalle (CIM : Composite Interval Mapping) combine la méthode du maximum de vraisemblance (SIM) et la régression multiple (Zeng, 1993, 1994). Cette méthode a des avantages par rapport au SIM, à l'analyse de marqueur simple et aux modèles multi-QTLs qui utilisent la régression multiple. Un des avantages de la méthode CIM qui est le plus important est que d'autres marqueurs peuvent être utilisés pour réduire le nombre et les positions du QTL et plus probable. De plus, la précision de la locations des QTLs peut être augmentée (Liu, 1998).

2.3. Contrôles génétiques de la germination et de la qualité des graines

2.3.1. Contrôle génétique de la germination

La germination de graine est déterminée par des composantes génétiques et environnementales (Whittington, 1973, Hodgkin et Hegarty 1978). Les études génétiques ont montré que le taux de germination sous contrainte hydrique est héritable chez la tomate (Foolad et Jones, 1991 ; Saleki et al. 1993). En revanche Bettey et al. (2000) ont rapporté une valeur faible d'héritabilité pour le temps moyen de germination en conditions normale et de contrainte hydrique (14 et 24% respectivement) chez le *Brassica oleracea*.

Le processus de germination est déterminé par des traits complexes, probablement contrôlés par nombreux gènes, qui exigent une approche QTL. Si les loci déterminant les composantes génétiques de la germination de graine sont identifiés, les sélectionneurs pourront choisir spécifiquement les allèles contribuant à l'amélioration de la germination. Al-Chaarani et al. (2005) a détecté quatre QTLs pour le pourcentage de germination et deux QTLs pour le temps de 50% de la germination chez le tournesol en condition irriguée. Les variances phénotypiques expliquées par ces QTLs varient entre 8% à 18%. Deux QTLs était également détecté pour le temps moyen de germination chez le *Brasica oleracea* (Betty et al. 2000). De nombreux QTLs ont été identifiés pour la germination en milieu salin, froid et sec

chez la tomate (Foolad et al. 1998, Foolad 1999 et Foolad et al. 2003). A notre connaissance, l'analyse de QTL pour des paramètres de la germination chez le tournesol sous contrainte hydrique n'est pas rapportée dans la littérature.

2.3.2. Contrôle génétique de la qualité des graines

Le croisement entre des mutants à fortes teneurs en acide oléiques, et des lignées à faibles teneurs, donne en F2 trois classes : riche, intermédiaire et pauvre en acide oléique. Il semblerait que la forte teneur en acide oléique soit contrôlée par un gène partiellement dominant désigné *Ol* (Fick, 1984). Urie (1985), Alonso (1988) et Schmidt et al. (1989) démontrent que le gène *Ol* est complément dominant. La présence d'un gène récessif modificateur, *ml*, qui augmente la teneur en acide oléique jusqu'à 82% lorsqu'il est combiné avec le gène *Ol*, a été démontrée par Miller et al. (1987). Par ailleurs Fernandez-Martinez et al., (1989) ont mis en évidence trois gènes dominants et complémentaires, *Ol₁*, *Ol₂* et *Ol₃* alors que Velasco et al. (2000) en avaient identifié 5 gènes grâce à une étude génétique. Une étude moléculaire, basée sur l'analyse QTL de la richesse en acide oléique a permis de détecter un QTL expliquant 84.5% de la variance phénotypique (Perez-Vich et al. 2000b). Les hypothèses établies afin d'expliquer la haute teneur en acide oléique dans les graines sont basées principalement sur le rôle de deux enzymes :

- I. La Stéaroyl-ACP-désaturase ($\Delta 9$ - désaturase) qui catalyse la première désaturation du stéaroyl-ACP en oléoyl-ACP (McKeon et Stumpf, 1982).
- II. L'oléoyl-phosphatidyl-choline-désaturase ($\Delta 12$ - désaturase) qui catalyse la seconde désaturation de l'oléoyl-PC (Slack et al. 1979 ; Stymne et Appelqvist, 1980).

Ainsi, une haute teneur en acide oléique (C18:0) dans les graines pourrait être due soit à une augmentation de l'activité enzymatique de la $\Delta 9$ - désaturase ou à l'affaiblissement de l'activité de la $\Delta 12$ - désaturase. Lacombe et Bervillé (2000a) avaient montré que la $\Delta 9$ -désaturase semble ne pas être impliquée dans la haute teneur en acide oléique, en étudiant l'accumulation des ARNm de cet enzyme chez des embryons à haute et à faible teneurs en acide oléique. En effet, aucune différence significative n'a été observée entre les deux types d'embryons. En outre, Lacombe et al. (2000) et Lacombe et Bervillé (2000a, 2000b) en utilisant une sonde d'ADNc de $\Delta 9$ - désaturase n'avaient identifié aucun marqueur

spécifique chez les génotypes à haute teneur en acide oléique. Des gènes codant pour la $\Delta 12$ - désaturase (OLD) constitueraient donc des candidats logiques pour les mutants *Ol*. La $\Delta 12$ - désaturase (OLD) est une enzyme membranaire qui catalyse l'apparition d'une double liaison sur l'acide oléique entre les carbones 12 et 13, ce qui convertit l'acide oléique en acide linoléique dans les graines.

Des mutants contenant des teneurs en acide stéarique (C18:0) six fois supérieures aux teneurs des variétés classiques ont été développés (Osario et al. 1995). Ces mutants ont été obtenus par traitement de graines à l'éthylméthane sulfonate de la lignée RDF-1-532. Plus récemment, un mutant à très haute teneur en C18:0 (supérieur à 35%) a été isolé (Fernandez-Moya et al. 2002). Le caractère de forte teneur en C18:0 est déterminé par deux loci qui subissent un effet épistasique par les loci responsables de la haute teneur en acide palmitique (C16:0) (Perez-Vich et al. 2000a). Un gène « *ES3* » responsable d'une très haute teneur en acide stéarique a été identifié par Perez-Vich et al. (2006) et ce gène est lié avec les marqueurs SSR *ORS243* et *ORS1161*.

Des mutantes « riches en acide palmitique (C16:0) » (environ 30%) ont été obtenues par irradiation des graines aux rayons X chez un génotype normal (CAS-5) (Osario et al. 1995) et un génotype oléique (CAS-12) (Fernandez-Martinez et al. 1997). Trois gènes sont responsables du caractère « riches en C16:0 » (Perez-Vich et al. 1998). Ce phénotype serait dû à un effet combiné de l'activité de deux enzymes intervenant dans la synthèse des acides gras (activité faible de la β -keto-acyl protéine synthase II et une haute activité thioestérase sur le palmitoyl-ACP (C16:0-ACP)) (Garcés et al. 2000).

2.4. Effets de la sécheresse sur la germination et la qualité des graines

2.4.1. Effets de la sécheresse sur la germination

La germination de graine est l'étape la plus sensible aux stress environnementaux (Cook, 1979; Jones, 1986). Le déficit hydrique est l'une des limitations les plus importante du développement et de la croissance des plantes en raison du rôle essentiel de l'eau dans le métabolisme des végétaux. Cependant, il existe une grande variation entre les espèces pour le potentiel hydrique minimum de la germination (Evans et Etherington 1990). Le potentiel hydrique de la graine sèche étant très faible (généralement entre -350 et -50 MPa) et le gradient pour la prise d'eau élevé, la germination peut se produire quand le potentiel hydrique

de l'environnement est dans la gamme physiologique de 0 à -2 MPa (Roberts et Ellis 1989). Pour simuler l'effet du potentiel hydrique du sol sur la germination, les semences sont souvent mises à germer dans des solutions plus ou moins concentrées de polyéthylène glycol (PEG), car ce composé n'est pas absorbé au cours de l'imbibition et permet de réaliser facilement des potentiels hydriques recherchés. De nombreuses études montrent que le taux et la vitesse de la germination sont diminués lorsque le potentiel hydrique du milieu diminue (Dahal et Bradford, 1990, Evans et Etherington 1990). Les semences de la plupart des espèces sont incapables de germer quand le potentiel hydrique du milieu est de l'ordre de -1.5 à -2 MPa. Demir Kaya et al. (2006) n'ont observé aucune germination avec un potentiel hydrique du milieu de -1.2MPa chez le tournesol.

2.4.2. Effets de la sécheresse sur la qualité des graines

2.4.2.1. Caractéristiques physiques : poids des graines et rapport coque / amande

Un stress hydrique pendant le remplissage de la graine affecte les caractéristiques physiques des graines comme leur taille (Baldini et al. 1999), leur poids (Unger, 1982a) et le pourcentage de coque (Connor et Hall, 1997). Le remplissage des graines dépend du fonctionnement photosynthétique du couvert et du transfert des photoassimilats. Dans de bonnes conditions d'alimentation hydrique, le remplissage des akènes s'effectue principalement grâce à l'assimilation post-floraison qui est conditionnée par l'état physiologique de l'appareil végétatif (Blanchet et Merrien, 1982). En conditions de stress hydrique, le remplissage des graines s'effectue plutôt à partir de la redistribution d'assimilats des feuilles vers le capitule provenant des organes végétatifs. L'alimentation hydrique joue un rôle important sur la survie du feuillage (Connor et al. 1985; Merrien et al. 1981), et par conséquent sur le maintien de l'activité photosynthétique. Souvent, celle-ci n'assure qu'une partie de la lipidogénèse et le complément est fourni par l'hydrolyse des composés glucidiques des tiges et des feuilles sénescents dont les produits sont redistribués vers les graines. Selon l'importance des deux sources, les graines sont plus ou moins bien remplies (Blanchet, 1987).

2.4.2.2. Teneurs en huile et en protéines

De manière générale, un stress hydrique appliqué après la floraison entraîne une diminution de la teneur en huile des graines. De brèves périodes d'exposition à un stress hydrique provoque

une réduction de la teneur en huile qui est associée à l'augmentation de la proportion de coque (Hall et al. 1985; Hall et al. 1990). Le stade d'application du stress hydrique joue un rôle capital dans l'élaboration de la fraction lipidique. (Talha et Osman, 1974). Les stades de sensibilité maximale de la plante pour la synthèse de la fraction lipidique concernent les phases finales du remplissage de la graine (Morizet et Merrien, 1990). La lipidogénèse s'effectue à partir des métabolites fournis par l'assimilation qui se produit en fin de cycle. Piva et al. (2000) précisent que les hautes teneurs en huile semblent dépendre de l'état hydrique de la plante pendant les phases F1-M0 (début floraison-début remplissage de la graine) et M0-M2 (début remplissage de la graine-fin remplissage de la graine) (Merrien, 1992). Baldini et al. (2002) observent également une réduction du taux d'huile (9 points) suite à un stress hydrique sévère alors qu'un stress hydrique modéré s'accompagne d'une augmentation du pourcentage d'huile. L'intensité de la contrainte hydrique s'avère également d'une grande importance dans la détermination de la teneur en huile. Ainsi, Santonoceto et al. (2003) notent un renforcement de ce taux corrélé positivement à l'apport d'irrigation de 33% à 100% de la satisfaction des besoins en eau de la culture. De manière générale, une conduite irriguée en phase post-florale permet d'améliorer le taux d'huile quelle que soit la situation (El Asri et al. 2000; Flagella et al. 2000; Mekki et al. 1999). Cette augmentation de la teneur en matières grasses s'accompagne d'une relative stabilité de la teneur en protéines des graines en condition de stress hydrique (Talha et Osman, 1974).

2.4.2.3. Composition en acides gras

Les relations entre la composition en acides gras de l'huile et la disponibilité hydrique restent encore mal connues et controversées. Ces résultats variables entre études résultent des différences dans les dates d'application et d'intensité du stress hydrique, ainsi que de la multiplicité de critères utilisés pour caractériser le niveau de disponibilité hydrique.

Quelques travaux (Baldini et al. 2000; Baldini et al. 2002) font ressortir l'effet positif du stress hydrique modéré sur la teneur en C18:1 (+5%) dans le cas de géotypes standard et oléique. Talha et Osman (1974) relèvent également une augmentation de cette teneur pour un stress appliqué au stade d'élongation et une diminution simultanée de la teneur en C18:2. Ces auteurs précisent que plus le stade d'application du stress est tardif, plus le ratio de C18:1/C18:2 diminue (de 2.09 pour le stade le plus précoce à 1.52 pour le stade le plus tardif). Néanmoins, une forte interaction géotype×régime hydrique introduit un élément de variabilité de la composition des graines supplémentaire. Dans le cas des acides gras saturés,

l'effet de la disponibilité hydrique varie également selon les conditions expérimentales. Un déficit hydrique durant le remplissage de la graine est associé à une augmentation des teneurs en acides gras saturés (Piva et al. 2000); alors que d'autres études n'enregistrent cette augmentation que pour le C18:0 (Flagella et al. 2002), ou aucune augmentation des acides gras saturés (Santonoceto et al. 2003).

MATERIELS ET METHODES

3. Matériels et Méthodes

3.1. Matériel végétal

3.1.1. La population des lignées recombinantes (RILs)

Des lignées recombinantes (RILs) d'*Helianthus annuus* L. utilisées dans nos expérimentations, ont été créées par la méthode SSD (Single Seed Descent) à partir du croisement entre les génotypes 'PAC2' et 'RHA266'. Notre laboratoire dispose d'un ensemble de 150 lignées recombinantes dont une partie a été utilisée pour la réalisation de nos expérimentations.

3.1.2. La population des mutants (M6)

Le laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes (BAP) a généré une lignée de tournesol appelée 'AS613' issue d'un croisement entre ENSAT-125 et ENSAT-704. Cette lignée a été choisie comme cible d'un traitement mutagène et des akènes ont alors été soumis à une irradiation gamma (75 grays) au Centre de Recherche du Commissariat à l'Energie Atomique de Cadarache, en France. Le laboratoire possède ainsi actuellement une collection de plus de 2000 mutants (M6) produite par autofécondation. Mon travail concerne l'étude de 30 mutants qui ont été choisis au vu de leurs différences phénotypiques avec la lignée d'origine AS613.

3.2. Conditions de culture

3.2.1. Conditions de culture pour les LIRs

3.2.1.1. Culture en conditions contrôlées (serre)

78 lignées recombinantes et leurs deux parents 'PAC2' et 'RHA266' ont été utilisés afin d'étudier la résistance au stress hydrique en conditions contrôlées. Les parents ainsi que

les lignées recombinantes ont été mises en culture en serre avec une plante par pot, dans un dispositif 'split-plot' en blocs randomisés avec deux traitements hydriques (bien irriguée et stressé) et trois répétitions pour chaque traitement. Cette expérimentation a été conduite en

conditions contrôlées. La croissance des plantes s'effectuait sous éclairage naturel à une intensité lumineuse moyenne estimée à $500 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (l'intensité maximale de l'éclairage enregistrée à 14 heures était de $1600 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) avec une photopériode d'environ 16 h, à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ jour, $18 \pm 2^\circ\text{C}$ nuit. L'humidité relative de l'air était comprise entre 65% et 85%. Les plantes sont arrosées normalement jusqu'au stade bouton floral (R1, Schneider et Miller 1981). A ce stade le déficit hydrique est appliqué sur la moitié des plantes (plantes « stressées »). L'autre moitié des plantes sont maintenues à une irrigation non limitante (plantes « bien irriguées »). Cette contrainte hydrique consistait à diminuer progressivement, l'arrosage de 100% à 30% de la fraction d'eau transpirable pendant 15 jours (soit une diminution d'approximativement 10% par trois jours). Les mesures physiologiques sont effectuées chez les plantes 'bien irriguées' et les plantes « stressées » après la période de déficit hydrique. Des irrigations modérées étaient ensuite effectuées afin de conserver un flétrissement de 50% des feuilles sur les plantes « stressées » jusqu'à la récolte.

3.2.1.2. Culture en conditions naturelles (champ)

100 lignées recombinantes et leurs deux parents 'PAC2' et 'RHA266' ont été utilisés afin d'étudier la résistance au stress hydrique en conditions naturelles. Les deux parents ainsi que les lignées recombinantes ont été mises en culture au champ à l'INRA- Auzéville, dans deux dispositifs (irrigué et non irrigué) en blocs randomisés avec trois répétitions. Chaque répétition, pour un parent ou une lignée recombinante, est constituée d'une parcelle de deux lignes de 4,6 m de longueur. L'intervalle entre les lignes est de 50 cm. La distance entre les plantes sur la ligne est de 25 cm conduisant à un nombre total de 32 plantes par parcelle (soit une densité proche de $6,5 \text{ plantes/m}^2$).

Deux conditions expérimentales sont appliquées à la culture au champ: « irriguée » et « non irriguée ». Les plantes dans la condition irriguée sont arrosées, deux fois, aux stades avant floraison (33 mm) et remplissage des graines (44 mm) selon le programme habituel de l'INRA- Auzéville. Tandis que la condition non irriguée n'a pas été arrosée.

3.2.2. Conditions de culture pour les mutants

3.2.2.1. Culture en conditions contrôlées (serre)

30 mutants M6 et leur lignée originelle (AS613) ont été utilisés afin d'étudier la résistance au stress hydrique en conditions contrôlées. La lignée originelle ainsi que les mutants ont été mis en culture en serre, dans un dispositif 'split-plot' en blocs randomisés avec deux traitements hydriques (bien irrigué et stressé) et trois répétitions pour chaque traitement. Les plantes sont arrosées normalement jusqu'au stade bouton floral (stade R1, Schneiter et Miller 1981). La moitié des plantes (les plantes dites «stressées») sont soumises à une contrainte hydrique modérée. Une irrigation permettant de maintenir un flétrissement de 50% des feuilles de la plante était poursuivie jusqu'à la récolte. Les conditions de culture sont identiques à celles présentées pour les LIRs.

3.2.2.2. Culture en conditions naturelles (toit roulant)

30 mutants M6 et leur lignée originelle ont été utilisés afin d'étudier la résistance au stress hydrique en conditions naturelles. La lignée originelle ainsi que les mutants ont été mis en culture au champ sous un toit roulant, dans deux dispositifs (irrigué et non irrigué) en blocs randomisés avec trois répétitions. Chaque répétition est constituée d'une parcelle d'une ligne de 1.6 m de longueur. L'intervalle entre les lignes est de 50 cm. La distance entre les plantes sur la ligne est de 20 cm conduisant à un nombre total de 8 plantes par parcelle.

La moitié des plantes avait subi une contrainte hydrique modérée, réalisée au stade bouton floral (stade R1, Schneiter et Miller 1981). A ce stade le déficit hydrique est provoqué par arrêt de l'arrosage jusqu'à la récolte. Une irrigation non limitante a été réalisée pour les plantes bien irriguées tout au long d'expérimentation.

3.2.3. Test pour l'évaluation des paramètres de germination

Des graines des 100 lignées recombinantes et de leurs deux parents (PAC2 et RHA-266) ainsi que des 30 mutants M6 et leur lignée originelle (AS613) ont été soumis à un test pour déterminer les paramètres de la germination. Le dispositif expérimental consiste en un essai en blocs randomisés avec trois répétitions. Chaque répétition par génotype a comporté une boîte de Pétri de 20 graines. Les graines ont été traitées par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium (CaCl_2O_2 à 5% w/v) pendant 20 minutes puis elles ont été rincées trois fois à l'eau distillée stérile. Ensuite, les 20 graines de chaque génotype ont été transférées en conditions stériles dans une boîte de pétri contenant 15 ml de milieu à base de phytigel

avec ou sans polyéthylène glycol (PEG 6000). Les graines sont ensuite observées tous les jours afin de déterminer les paramètres de germination.

3.2.3.1. *Traitement témoin*

Les 20 graines sont déposées dans une boîte de pétri sur un milieu à 0.3% de phytigel (6000) contenant du CaCl_2 à 2 mM. Le CaCl_2 permet au phytigel de former un gel suite à l'autoclavage (120°C pendant 20 min). Les boîtes de pétri sont en suite placées à l'obscurité (à l'aide de papier aluminium) et à 25°C -16h le jour / 20°C-8h la nuit dans un phytotron pour le suivi de la germination.

3.2.3.2. *Traitement contraint hydrique*

La seule différence par rapport à la condition de culture « témoin », porte sur la nature du milieu de culture utilisé. Il s'agit ici d'un milieu à 0.5% de phytigel et à 28% de PEG 6000 permettant d'obtenir un potentiel hydrique du milieu de culture proche de -1.3 MPa (contre -0.3 MPa pour la condition témoin).

3.3. *Paramètres étudiés*

3.3.1. Paramètres de qualité de la graine

Les paramètres de qualité de la graine (teneurs en protéines et huile et composition en acides gras) sont déterminés par spectrométrie proche infrarouge (SPIR). Un échantillon de 40 gr de graines de tournesol par génotype, par condition et par répétition a été broyé dans un moulin « Knifetec 1095 » (Foss Tecato, Höganäs, Suède) trois fois durant 10 secondes. L'échantillon est ensuite analysé par spectrométrie proche infrarouge à l'aide du Foss NIR 6500 (Foss Analytical, Danemark). Chaque échantillon a été placé sur la cellule en quartz et l'ensemble est bloqué avec un joint en silicone noir. Pour chaque échantillon, la mesure est réalisée sur les deux faces afin de s'affranchir de la différence spectrale. La moyenne entre les deux spectres s'effectue automatiquement. Les valeurs de réflectance $[\log (1/R)]$ de chaque échantillon sont mesurées entre 400 et 2500 nm à intervalles de 2 nm. Les pourcentages de protéines (PC), d'huile (OC) aussi bien que les teneurs en acide palmitique (PA), acide stéarique (SA), acide oléique (OA) et acide linoléique (LA) sont ensuite calculées par le système FOSS Nir (Ayerdi Gotor et al. 2007).

3.3.2. Paramètres de la germination

Le test pour l'évaluation des paramètres de la germination a consisté à effectuer un suivi de la germination des graines au cours du temps dans deux conditions de cultures (avec ou sans PEG 6000). Le nombre de graines germées a été déterminé deux fois par jour jusqu'à ce que le pourcentage soit stable entre cinq observations successives, et ainsi le pourcentage de germination définitif du génotype est déterminé. La germination a été caractérisée à partir de 4 paramètres :

- Le pourcentage maximal de germination, (PSG).
- Le temps de début de germination (h), (TSG).
- Le temps pour atteindre 50% du taux maximal de germination (h), (T50%G).
- Le temps pour atteindre le taux maximal de germination (h), (TMG).

Avant la réalisation du test d'évaluation des paramètres de germination, le poids de 1000 graines (1000 GW) et pourcentage d'huile (OC) ont été déterminés, (OC par Résonance Magnétique Nucléaire).

3.4. Méthodes d'analyse génétique

3.4.1. Variabilité génétique et gain génétique

Des analyses de variance par PROC GLM (SAS Institut Inc, NC, USA) ont été effectuées sur les différentes populations étudiées (RILs et mutants) pour déterminer la variabilité génétique. Le gain génétique (GG) qui présente la différence de moyennes entre les 10% des meilleures LIRs sélectionnées et le meilleur parent a été calculé pour tous les caractères étudiés. La corrélation simple entre tous les caractères étudiés a été effectuée par SAS PROC CORR. Une analyse multivariée par SAS PROC PRINCOMP a été appliquée pour les acides gras. Une analyse «bipolt» a été réalisée pour les paramètres de germination à l'aide de R version 2.7.1 Patched.

3.4.2. Détection des QTLs chez les lignées recombinantes (LIRs)

La recherche de QTLs a été effectuée grâce au logiciel WINQTL CART version 2.5 en utilisant le modèle 6 (CIM : Composit Interval Mapping) (Wang et al. 2005). Ce modèle prend en considération deux paramètres : le nombre de marqueurs qui contrôlent le fond génétique et la taille de la fenêtre qui limite des deux côtés des marqueurs flanquant le site testé. Cette procédure rend l'analyse plus sensible à la présence de QTLs dans l'intervalle ciblé. A chaque intervalle, le degré de signification des associations entre mesures et marqueurs est estimé par le LRS (Likelihood Ratio Statistic) traduit comme le rapport statistique de vraisemblance (Haley et Knott 1992). Ce rapport correspond statistiquement au test χ^2 (Manly et Olson 1999). Dans cette étude, le nombre de marqueurs pour contrôler le fond génétique était fixé à 15 (nm = 15) et la taille de la fenêtre à 15 cM (w = 15).

3.4.3. Identification de marqueurs individuels

L'association entre les marqueurs d'AFLP et les caractères étudiés dans la population de mutants a été estimée par analyse de variance ou analyse de régression multiple par étapes, où les caractères ont été traités comme variables dépendantes tandis que les marqueurs d'AFLP étaient traités en tant que variables indépendantes (Vijayan et al. 2006).

3.5. La carte génétique

Dans notre laboratoire, Flores Berrios et al. (2000a) ont construit une carte génétique en utilisant des marqueurs d'AFLP sur une population de 130 lignées recombinantes issues du croisement entre 'PAC2' et 'RHA266'. Cette carte génétique a été complétée en y ajoutant d'autres marqueurs (Al-Chaarani et al. 2004a), puis améliorée pour établir une nouvelle carte génétique basée sur 191 SSRs et 304 AFLPs (Poormohammad Kiani et al. 2007). Cette carte présente une longueur de 1824.7 cM et une densité d'un marqueur par 3.7 cM. Les groupes de liaisons sont nommés en comparant les positions des SSRs communs entre notre carte et la carte génétique référence du tournesol construit par Tang et al. (2002) avec 459 SSRs. Les marqueurs, distribués sur tous les groupes de liaisons de notre carte, permettent une « cross-reference » complète avec d'autres cartes SSR/INDELs et SSR/SNP (Yu et al. 2003 ; Lai et al. 2005).

ANALYSE GENETIQUE DE LA GERMINATION ET
DE LA QUALITE DES GRAINES CHEZ DES
LIGNEES RECOMBINANTES DE TOURNESOL
SOUS CONTRAINTE HYDRIQUE

4. Analyse génétique de la germination et de la qualité des graines chez des lignées recombinantes de tournesol sous contrainte hydrique

4.1. Introduction

La sécheresse est considérée comme le facteur le plus limitant de la germination, de la croissance et de la productivité des plantes cultivées. La germination est définie le processus limité par l'imbibition de la graine et le commencement de l'élongation de la radicule. Il s'agit d'un phénomène où la graine passe de l'état de vie ralentie à l'état de vie active (Caboche et al. 1998). La germination de la graine d'une plante oléagineuse implique la dégradation des réserves lipidiques par l'action séquentielle et/ou collective de beaucoup d'enzymes hydrolytiques (Lin et Huang 1983 ; Wang et Huang 1987 ; Feussner et al. 1996 ; Sadeghipour et Bhatla 2002). Les paramètres de germination sont des caractères complexes, contrôlés par de nombreux gènes, qui exigent une analyse de QTL (Bohuon et al. 1998; Kearsey, 1998). Une étude sur l'identification des régions chromosomiques impliquées dans le contrôle génétique des paramètres de germination chez le tournesol a été publiée par Al-Chaarani et al. (2005). Ces auteurs ont détecté quatre QTLs pour le pourcentage de germination et deux pour la vitesse de germination en l'absence de contrainte hydrique. A notre connaissance, l'analyse génétique de la germination dans des conditions de contrainte hydrique chez le tournesol n'est pas reportée dans littérature. Un des volets de ma thèse a consisté à mener une telle analyse sur deux populations de tournesol (lignées recombinantes et mutants). Parallèlement aux processus impliqués dans les performances agronomiques des génotypes sous contrainte hydrique, la qualité des graines à la récolte est un critère déterminant pour la valorisation de la production. Il est nécessaire de renforcer le potentiel de sélection d'hybrides associant performances agronomiques et qualité des graines (teneurs en huile et en protéines et composition en acides gras). Les travaux de recherches effectués afin de déterminer le contrôle génétique des caractères de la qualité de la graine du tournesol sont nombreux. Nous pouvons citer par exemple les études relatives à la teneur en huile des graines (Mestries et al. 1998; Mokrani et al. 2002; Leon et al. 2001, 2003; Al-Chaarani et al. 2004a), à la composition de l'huile en acides gras (Burke et al. 2005 , Pérez-vich et al. 2004a,b). L'héritabilité des caractères de qualité de la graine de tournesol comme le poids de 1000 graines (Sujatha et al.

2002) et le pourcentage d'huile des graines (Mokrani et al. 2002, Leon et al. 2003) ont des valeurs d'héritabilité élevée entre 0.47 et 0.77. A notre connaissance le contrôle génétique des protéines chez le tournesol n'est pas reporté dans la littérature, mais une forte héritabilité a été observée pour les protéines de réserves de la graine chez le colza (Felde et al. 2006 et Gül, 2002). Généralement, l'augmentation de la teneur en huile des hybrides est obtenue par l'amélioration de la richesse en huile des parents, sélectionnés à la fois pour un plus faible pourcentage de coque par rapport au poids des graines et pour un plus fort pourcentage d'huile dans l'amande (Fick, 1978).

La période de remplissage des graines est critique pour la détermination de la teneur en huile dans les graines, ce qui peut être perturbé par la sécheresse (Connor et Hall, 1997). Le tournesol est particulièrement sensible à la sécheresse lors des périodes d'apparition du bouton floral (R1) et de la floraison. Dans plusieurs travaux sur le tournesol la contrainte hydrique a été appliquée dès le stade bouton floral (R1) afin d'évaluer l'effet de la sécheresse sur différents caractères physiologiques (Poormohammad Kiani et al. 2007; Flagella et al. 2002; Maury et al. 2000 et Pankovic et al. 1999). Un stress hydrique sévère pendant le remplissage des graines a un effet sur le volume de la graine (Baldini et al. 1999), le poids de la graine (Unger, 1982b) et le pourcentage de coque (Connor et Hall, 1997) chez le tournesol. De brèves périodes d'exposition à un stress hydrique provoquent une réduction de la teneur en huile qui est associée à l'augmentation de la proportion de la coque par rapport à l'amande (Hall et al. 1985; Hall et al. 1990; Nel et al. 2002). Egalement la teneur en acide oléique peut être fortement influencée par l'environnement (Harwood 1996). Le déficit hydrique sévère pendant le remplissage de graine diminue la teneur en acide oléique de 10% à 16%, et augmente celle en acide linoléique, chez le tournesol (Roche et al. 2006).

Plusieurs QTLs ont été rapportés pour le poids de l'amande, le poids de la coque et le ratio coque/amande (Tang et al. 2006). Leon et al. (2003) ont détecté deux QTLs associés à la teneur en huile et la date de floraison. Les études génétiques montrent que la teneur en huile des graines, ainsi que les composantes du rendement sont contrôlées principalement par des gènes à effets additifs (Gupta et Khanna 1982; Bedov 1985 et Al-Chaarani et al. 2004a). Pérez-Vich et al. (2002b) ont détecté deux QTLs principaux pour la teneur en acide stéarique et en acide oléique sur les groupes de liaison 1 et 14, correspondant au « stéaroyle-ACP désaturase » et au « d'oleoyl-PC désaturase » loci, qui co-ségrègent avec les gènes

« *EsI* » et « *Ol* », respectivement.

L'amélioration de la qualité des graines dans des conditions de contraintes hydriques consiste à combiner des QTLs spécifiques de stress hydrique avec ceux impliqués dans l'élaboration de la qualité de la graine. A notre connaissance, des QTLs contrôlant la qualité des graines en condition de déficit hydrique n'ont pas été identifiés à ce jour chez le tournesol.

Dans ce cadre, mon travail de recherche a consisté à : (1) analyser la variabilité génétique et rechercher des QTLs pour des paramètres associés à la germination du tournesol sous contrainte hydrique, (2) identifier des QTLs impliqués dans la variation génétique de caractères de qualité des graines (teneur en huile et en protéines, composition en acides gras) en condition de stress hydrique. Les expérimentations ont été conduites dans différents environnements : en conditions contrôlées (serre) et naturelles (champ).

Les résultats ont fait l'objet de trois articles suivants:

1- Ebrahimi, A., Maury, P., Grieu, P., Sarrafi, A. 2008. Genetic variability and QTL mapping for seed germination parameters under drought stress in sunflower. *Plant Breeding* (soumis).

2- Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Poormohammad Kiani, S., Nabipour, A., shariati, F., Grieu, P., Sarrafi, A. 2008. QTL mapping of seed quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. *Genome*, **51**: 599–615.

3-Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Grieu, P., Sarrafi, A. 2008. Genetic control of protein content and seed characteristics under water-stress condition in sunflower. *Genome* (soumis).

Genetic variability and QTL mapping for seed germination parameters under drought stress in sunflower.

A. Ebrahimi^{1,2}, P. Maury^{2,3}, P. Grieu^{2,3*} and A. Sarrafi^{1*}

¹INP-ENSAT, IFR 40, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), F-31326 Castanet Tolosan, France

²INRA, UMR 1248 AGIR, F-31326 Castanet Tolosan, France

³ENSAT-INP, F-31326 Castanet Tolosan, France

* Ph.D-supervisors

Corresponding author: Professor Ahmad Sarrafi

Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), IFR 40, INP-ENSAT, 18

Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France

e-mail : sarrafi@ensat.fr

Tel: + 33 5 62193580

Fax: + 33 5 62193580

Abstract

The objective of this research was to identify the genetic control of germination parameters under control and drought conditions in sunflower. A population of 100 recombinant inbred lines obtained from a cross between PAC2 and RHA266 was used in the present study. Our experiments were performed using a randomized blocks design with three replications. Germination parameters were the reference times of germination and percentage of seed germination (PSG). The putative causes of variation in germination as oil content (OC) and 1000 grain weight (1000GW) were also measured. Positive correlations were obtained between reference times of germination for control and drought conditions. Positive correlations were observed between PSG and OC, as well as between 1000 GW and the reference times of germination. Several non-specific QTLs to drought were detected for germination parameters. “*HA1837*”, “*SSL27*” and “*ORS671_I*” are the SSR markers associated to QTLs detected for germination parameters independent of germination conditions. The most important specific QTL was associated to “*ORS677*” SSR marker with 24% of phenotypic variance for PSG trait in drought condition.

Key words: drought stress- QTL- reference times of germination- SSR marker

Introduction

Seed germination and early seedling growth are the most sensitive stages for environmental stresses (Cook 1979; Jones 1986). Water stress is one of the most severe limitations of crop growth in semi-arid and arid regions of the world as it plays a vital role in plant metabolism at all growth stages. However, depending on plant species, water stress could be critical for germination and seedling development.

Genetic studies have shown that the relative ability to germination in salt or osmotic solution is heritable in tomato (Foolad and Jones, 1991; Saleki et al. 1993). In the other hand, Bettey et al. (2000) reported a low value for heritability of mean germination time under control and stressed conditions (14 and 24% respectively) in *Brassica oleracea*. Foolad et al. (2003) reported significant genetic correlations among seed germination rate under cold, salt and PEG treatment in tomato. The genes with additive action conferred high germination speed while slow germination speed appeared to be induced by genes with pleiotropic effects in *Eustoma grandiflorum* (Ecker et al. 1994). High significant genetic correlation was observed between germination and grain weight in soybean (Singh et al. 1978).

There is a wide variation among species in the minimum water potential permitting growth (Evans and Etherington 1990). Since the water potential of dry seed is very low (generally between -350 and -50 MPa) and the gradient for water uptake is large, when water in the environment is in the physiological range, germination can occur, from 0 to approximately -2 MPa (Roberts and Ellis 1989). According to Heydecker et al. (1975) polyethylene glycol (PEG) is commonly used as an osmotic-priming agent, because of its relatively inert and non-toxic nature. PEG was used for drought treatment in sunflower germination with different concentration e.g., Lenzi et al. (1995), Turhan and Baser (2004).

Seed germination in oilseed plants involves degradation of oil bodies by sequential and/or collective action of many hydrolytic enzymes such as proteases, phospholipases, lipoxygenase and lipase at different stages of lipolysis (Lin and Huang 1983; Wang and Huang 1987; Feussner et al. 1996; May et al. 1998; Sadeghipour and Bhatla 2002). Ujjinaiah et al. (1989) reported that higher seed oil percentage will lead to higher germination percentage in sunflower. While, Ahmad (2001) observed the negative correlation between oil content and germination percentage in sunflower. Three mutant genes were identified in *Arabidopsis thaliana* that decrease water potential for seed germination in salty or osmotic (mannitol) solutions (Saleki et al. 1993). Two genes, encoding isocitrate lyase (*IL*) and malate synthase (*MS*), are detected for germination and postgerminative in gene expression programmes. *IL*

and *MS* are important glyoxylate cycle enzymes involve in stored lipids mobilization in plant seedlings.

In-vitro screening methods are known to provide rapid and easy screening tests for genotypes responses to drought stress factors. Moreover, genetic markers have become an important tool in the selection and screening of plants for environmental stresses, for detecting genetic variability (Jahromi 1996). Germination and emergence characteristics are complex traits, likely to be controlled by a number of genes, and therefore require quantitative trait loci (QTL) analysis. These analysis integrates molecular marker linkage maps with data obtained on quantitative traits to give information on the effects and locations of the loci which controlling them (Kearsey 1998). Al-Chaarani et al. (2005) detected four QTLs for germination percentage and two QTLs for time of 50% germination in sunflower in non-drought condition. In water stress condition, one QTL was obtained for mean germination time in *Brasica oleracea* (Betty et al. 2000). Some QTLs were identified for salt, cold and drought tolerance during seed germination in tomato (Foolad et al. 1998, Foolad 1999 and Foolad et al. 2003).

As far as we know, the QTL analysis for germination parameters of sunflower in water stress conditions is not reported in the literature.

The aim of this study is to identify the chromosomal regions which have effects on seed germination parameters in control and PEG treatment conditions.

Materials and methods

Plant material and experimental conditions

A population of 100 recombinant inbred lines (RILs) was developed through single-seed descent from a cross between PAC2 and RHA266. The RIL population and their two parents were used in order to determine the genetic variability of seed germination parameters.

Our experiments were performed in control and PEG treatment conditions. Sterile germination medium containing 0.3% w/v Phytigel was prepared for control and PEG treatment conditions. The germination medium for the drought treatment included also 0.28% w/v polyethylene glycol (PEG 6000), corresponding to -1.3 MPa of water potential (Lenzi et al. 1995, Foolad et al. 2003). The seeds were surface-sterilized with 0.5% calcium hypochloride and washed three times in sterile, distilled water and briefly blotted. The seeds were then transferred to petri dishes (95 mm diameter) containing the special medium. Each Petri dish contained 20 seeds (one replication). Petri dishes were placed in a factorial design

in incubators maintained in dark where the temperature was 25°C for day (16 h) and 20°C for night (8h). The experiment consisted of a randomized block design with three replications.

Trait measurements

The number of germinated seeds was determined for each treatment per genotype per replication two times a day until the time of the percentage of germination was stable in five successive observations. The time to starting germination (TSG) was determined when the protrusion of the radicle was observed for at least one seed in the Petri dish. The time to maximum germination (TMG) was determined when for the first time the percentage of seed germination (PSG) was stable. The time to 50% germination (T50%G) corresponds to 50% of total germinated seeds in the Petri dish. Oil content (OC) was determined by Nuclear Magnetic Resonance and 1000 grain weight (1000GW) were measured per genotype per replication.

Statistical analyses and QTL mapping

The data was analyzed using the SAS PROC GLM (SAS Institute Inc, NC, and USA, 1996). A mixed model with water treatment as fixed effect, and genotypes (RILs and parents) as random effect was used for analysis of the data in the two conditions. Biplot analysis was performed for both conditions by R version 2.7.1 Patched software programme.

Sunflower reference map recently constructed by Poormohammad Kiani et al. (2007) in our department, was used for detection of QTLs. This map contains 304 AFLP and 191 SSRs markers with mean density of 3.7 cM per locus. For mapping of QTLs and estimation of their effects, the method of composite interval mapping model 6 on Win QTL Cart (Version 2.5) was used (Wang et al., 2005). The control marker number and the window size were 15 and 15 cM, respectively. The experiment-wise threshold level to declare linkage was calculated from 1000 permutations of each genotype marker against the phenotype in the population. Linkage was reported as significant if the two statistics for a marker were greater than the critical value at $P=0.05$ as described by Kassem et al. (2007).

Results

Phenotypic variation

Analysis of variance of the RILs and their parents (“PAC2” and “RHA266”) showed highly significant variation between genotypes and water treatments for all the germination parameters studied (Table 1). ‘water treatment× RIL’ was also significant indicating a difference among RILs in the responses of germination to drought.

Phenotypic performance of RILs and their parents for all the traits are summarized in Table 2. Differences between the parents was significant for PSG and TMG under PEG treatment. Genetic gain presented as the difference between the mean of the top 10% selected RILs (\bar{X} 10%RIL) and the mean of the parents (\bar{X} P) was significant for PSG under PEG treatment. There were positive correlations between the reference times of germination (TSG, T50%G and TMG) in both conditions (PEG treatment and control) (Fig 1). Positive correlations were observed between PSG and OC in both conditions, as well as between 1000 GW and the reference times. Negative correlations were observed between OC and PSG with references times for germination in both conditions.

QTL mapping

The map position and characteristics of QTL associated with the studied traits are summarized in Table 3. QTLs were designated by 1 and 2, for control and PEG treatment, followed by the abbreviation of the trait (TSG, T50%G, TMG and PGS), the corresponding linkage group and the number of QTL in the group. For an easier overview of overlapping QTLs between traits and culture media (control and PEG treatment conditions), all QTL regions are illustrated in Fig 2. The QTLs explained from 5% to 29% of phenotypic variance (R^2) of the traits. The phenotypic variances explained by the QTLs for the time to starting germination (TSG) trait ranged from 5% to 20%. The positive alleles for the most important QTL of TSG (2.TSG.11.1) under PEG treatment ($R^2 = 20\%$) come from RHA266. The most important QTLs for T50%G are 1.T50%G.11.1, 1.T50%G.10.1, 2.T50%G.5.2 and 2.T50%G.1.1 which respectively explained 29, 24, 17 and 13% of individual phenotypic variance of this trait under control and PEG treatment media. Positive alleles for these QTLs come from RHA266 except for “1.T50%G.10.1”. For the time to maximum germination (TMG) trait, the most important QTL (1.TMG.11.2) was on LG11 and RHA266 alleles decreased TMG. The most important QTL for PSG (2. PSG.17.3) was located on LG 17 ($R^2=24\%$) under PEG treatment medium and positive alleles for this QTL come from PAC2.

Discussion

Phenotypic variation between genotypes

PEG treatment affected all of germination parameters significantly. In addition, there were differences between the RILs in term of their response to drought, which is in agreement with the results of Turhan and Baser (2004) and Lenzi et al. (1995) in sunflower. Water treatment×RIL interaction was significant, suggesting that response by a genotype in relation to other genotypes varies between the two germination media. Correlations were positive between all reference times of germination (TSG, T50%G and TMG) under control and PEG treatment. The same results were observed by Foolad et al. (1998) in tomato under salt stress. The strong correlations among the times of germination indicated conceivably that similar or identical genes and physiological mechanisms control the important times of germination (TSG, T50%G and TMG) in sunflower seed germination under control and PEG treatment.

Negative correlations between PSG with reference times of germination (TSG, T50%G and TMG) were obtained under both conditions, which confirm the result of Al-Chaarani et al. (2005) under normal condition in sunflower. This result indicates that rapid germination is associated with a high percentage of germination. Negative correlations between OC and reference times of germination indicates that genotypes with a high percentage of seed oil content have a rapid seed germination. Negative correlation was observed between 1000 GW with PSG, which is also reported by Singh et al. (1978) in soybean and Torres et al. (1991) in sunflower. Some genotypes like C62, LR16a, C89, C101 and C115 present high values for germination parameters under control and PEG treatment (Fig 2).

Significant differences were observed between the parents under PEG treatment for PSG and TMG (Table 2). This result suggests that parental lines carry different genes for adaptation to water stress. Genetic gain, considered as the difference between the mean of the 10% selected RILs and the mean of the parents ($\bar{X} P$), was significant for PSG under PEG treatment, showing transgressive segregation for the trait.

QTL analysis

QTLs identified in the present study showed that several putative genomic regions were involved in the expression of the germination traits under two experimental conditions (Table 3). Two types of QTLs for germination parameters were identified: QTL which affected

germination parameters in control and PEG treatment media (non-specific QTL) and QTLs which affected germination parameters only under one media, control or PEG treatment (specific QTL). The identification of non specific QTLs indicated the presence of relationships between germination parameters under PEG treatment and control conditions. However, whether such genetic relationships are due to pleiotropic effects of the same genes, physical linkage of different genes, or combination of the two, it could not be determined in this study. Isolation and characterization of functional genes affecting germination rate under different conditions may resolve this issue. The detection of non-specific QTLs however is consistent with the significant correlations observed between germination parameters under control and PEG treatment conditions (Table 4). The results are also in agreement with positive correlation between rate of tomato seed germination under non-stress and stress (cold and salt) conditions (Foolad and Lin 1999, Foolad et al. 1999).

Linkage group 11 was most important in reference times of germination in sunflower with seven QTLs for TSG, T50%G and TMG under both conditions (non specific). All of the favorable alleles for these reference times on linkage group 11 come from RHA266 except *2.TMG.11.1* QTL.

Five of these QTLs (*1.TSG.11.1*, *2.TSG.11.1*, *1.T50%G.11.1*, *2.T50%G.11.1* and *1.TMG.11.2*) were overlapped, this region probably has pleiotropic effect for the reference times of sunflower germination. Two other ones (*1.TMG.11.1* and *2.TMG.11.1*) are also overlapped in this linkage group (11). Thus this linkage group is important for reference time of germination in control and PEG treatment conditions. The high number of overlapping QTLs for germination parameters is confirmed also by positive correlations which are observed between all reference times of germination (Fig 2). Bettay et al. (2000) also detected the overlapping of reference times of germination in *Brassica oleracea*. Two SSR markers: “*HA1837*” under control and PEG treatment media and “*ORS499*” under control condition are linked to TSG on linkage group 15. Another SSR marker (*SSL33*) is linked to TSG (*1.TSG.14.1*) which has been observed by Al-Chaarani et al. (2005) for seedling shoot length trait under non-stressed condition. We detected also another marker “*E37M61_6*” linked to PSG which was reported for percentage of normal seedling by Al-Chaarani et al. (2005). The QTL for time to maximum germination (*1.TMG.8.1*) was overlapped with the QTL of PSG (*2.PSG.8.1*) in linkage group 8. This region has probably pleiotropic effects for the traits. In linkage group 4, non-specific QTLs (*1.PSG.4.1* and *2.PSG.4.1*) were detected with phenotypic variation (R^2) 9% and 17%; the favorable alleles come from PAC2. This region

could be important in breeding programmes as it is linked to SSR marker “*ORS671-I*” controlling PSG under non-stress and drought stress conditions in sunflower.

There was an important overlapping QTL for TSG (*1.TSG.15.1* and *2.TSG.15.1*) under both water treatments. These latter QTLs were linked to SSR marker “*HA1837*” and the favorable alleles for both QTLs under both water treatments come from RHA266. The SSR marker “*SSL27*” was linked to TMG under both water treatment in linkage group 11. The favorable alleles for the QTLs (*1.TSG.14.2* and *1.TMG.10.2*) come from different parents under each water treatment condition which show the existence of different alleles for resistance to drought in different parents for the identified QTLs. We found also two QTLs for reference times of germination which are reported for seed oil content by Ebrahimi et al. (2008). These common QTLs in both studies confirm again the effect of OC for reducing reference times of germination.

Linkage group 17 was interesting for germination tolerance to PEG treatment with three QTLs for PSG. The most important (*2.PSG.17.3*) was linked to SSR marker “*ORS677*” with phenotypic variance (R^2) 24%. Several specific QTLs for PSG were identified for drought tolerance which were linked to SSR markers in linkage groups 2, 3, 4, 8 and 17.

As far as we know, there is only one QTL study on germination of sunflower in which 4 QTLs for PSG have been detected (Al-chaarani et al. 2005) with only one linked SSR (*ORS53*) marker. Our research can be considered as a crucial study in sunflower germination since among 10 detected QTLs of PSG, 6 of them are associated to the SSR markers (*ORS229*, *HA3938*, *ORS671-I*, *SSL30*, *ORS297* and *ORS677*).

Two of them (*SSL30* and *ORS297*) are linked to palmitic and linoleic acid content respectively (Ebrahimi et al. 2008).

In conclusion, 52 QTLs were identified for germination parameters under control and PEG treatment conditions in the present study. The correlation between control and PEG treatment was highly significant for all traits except for TMG (Table 4) which may explain the co-locations of the corresponding QTLs. A low rate of seed germination under PEG treatment is due to reduced water potential of the germination medium (Bradford 1995). Therefore, it is expected that seed with rapid germination under drought would also germinate rapidly under control. This is in agreement with our findings, which indicated the presence of a significant correlation for the rate of germination under control and PEG treatment condition (Table 4). These results support the suggestion that the same genes or physiological mechanisms may control the rate of seed germination under control and drought conditions. Isolation,

characterization and comparison of functional genes, which facilitate rapid seed germination under control and PEG treatment conditions, would be necessary to verify this suggestion.

The identification of specific and non specific QTLs for germination-related traits, indicate that marker assisted selection may result in the development of germplasm with improved germination under non-stress and drought conditions.

References

- Ahmad, S., 2001: Environmental effect on seed characteristics of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Agron. Crop Sci.* **187**, 213-216.
- Al-Chaarani, G. R., L. Gentzbittel, M. Wedzony, and A., Sarrafi, 2005: Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Science* **169**, 221-227.
- Basten, C. J., B. S. Weir, and Z. B. Zeng, 2001: QTL Cartographer, Version 1.15 Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Betty, M., W. E. Finch-savage, G. J. King, and J. R. Lynn, 2000: Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in *Brassica oleracea*. *New Phytol.* **148**, 277-286.
- Bradford, K. J., 1995: Water relations in seed germination. In: J. Kigel, and G. Galili, (eds), *Seed development and germination*, 351-396. New York.
- Cook, R. E., 1979: Patterns of juvenile morbidity and recruitment in plants. In: O. T. Solbrig, S. Jain, G. B. Johnson, and P. H. Raven (eds.), *Topics in Plant Population Biology*, 207-301. Columbia University Press, Los Angeles.
- Ebrahimi, A., P. Maury, M. Berger, S. Poormohammad Kiani, A. Nabipour, F. Shariati, P. Grieu, and A. Sarrafi, 2008 : QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. *Genome* **51**, 599-615.
- Ecker, R., A. Barzilay, and E. Osherenko, 1994: The genetic relations between length of time to germination and seed dormancy in *lisianthus* (*Eustomia grandiflorum*). *Euphytica* **80**, 125-128.
- Evans, C. E., and J. R. Etherington, 1990: The effect of soil water potential on seed germination of some British plants. *New Phytol.* **115**, 539-548.
- Feussner, I., B. Hause, A., Nellen, C. Wasternack, and H. Kindl, 1996: Lipid-body lipoxxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxxygenase forms. *Planta* **198**, 288-293.
- Foolad, M. R., and R. A. Jones, 1991: Genetic analysis of salt tolerance during germination in *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* **81**, 321-326.
- Foolad, M. R., F. Q. Chen, and G. Y. Lin, 1998: RFLP mapping of QTLs conferring salt tolerance during germination in an interspecific cross of tomato. *Theor. Appl. Genet.* **97**, 1133-1144.

- Foolad, M. R., G. Y. Lin, and F. Q. Chen, 1999: Comparison of QTLs for seed germination under non-stress, cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breeding* **118**, 167-173.
- Foolad, M. R., 1999: Genetics of salt tolerance and cold tolerance in tomato: Quantitative analysis and QTL mapping. *Plant Biotechnol.* **16**, 55-64.
- Foolad, M. R., and G.Y. Lin, 1999: Relationships between cold and salt-tolerance during seed germination in tomato: Germplasm evaluation. *Plant Breeding* **118**, 45-48.
- Foolad, M. R., L. P. Zhang, and P. Subbiah, 2003: Genetics of drought tolerance during seed germination in tomato: inheritance and QTL mapping. *Genome* **46**, 536-545.
- Heydecker, W., J. Higgins, Y. J. Turner, 1975: Invigouration of seeds. *Seed Science and Technology* **3**, 881-888.
- Jahromi, P. H., 1996: Genetic studies on salty tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.), PhD Thesis, The University of Reading, UK.
- Jones, R. A., 1986: High salt-tolerance potential in *Lycopersicon* species during germination. *Euphytica* **35**, 576-582.
- Kassem, A. M., K. Meksem, A. J. Wood, and D. A. Lightfoot, 2007: A microsatellite map developed from late maturity germplasm 'Essex' by 'Forrest' detects four QTL for soybean seed yield expected from early maturing germplasm. *Rev. Biol. Biotech.*, **6**, 11-19.
- Kearsey M. J., 1998: The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany* **49**, 1619-1623.
- Lenzi, A., M. Fambrini, S. Barotti, C. Pugliesi, and P. Vernieri, 1995: Seed germination and seedling growth in a wilty mutant of sunflower (*Helianthus annuus* L.): effect of abscisic acid and osmotic potential. *Environmental and Experimental Botany* **35**, 427-434.
- Lin, Y., and A. H. C. Huang, 1983: Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* **225**, 360-369.
- May, C., R. Preisig-Müller, M. Höne, P. Gnau, and H. Kindl, 1998: A phospholipase A2 is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1393**, 267-276.
- Poormohammad Kiani, S., P. Talia, P. Maury, P. Grieu, R. Heinz, A. Perrault, V. Nishinakamasu, E. Hopp, L. Gentzbittel, N. Paniego, and A. Sarrafi, 2007: Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci.* **172**, 773-787.
- Roberts, E. H., and R. H. Ellis, 1989: Water and seed survival. *Annals of Botany* **63**, 39-52.

- Sadeghipour, H. R., and S. C. Bhatla, 2002: Differential sensitivity of oleosins to proteolysis during oil body mobilization in sunflower seedlings. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1117-1126.
- Saleki, R., P. G. Young, and D. D. Lefebvre, 1993: Mutants of *Arabidopsis thaliana* Capable of Germination under Saline Conditions. *Plant Physiol.* **101**, 839-845.
- Singh, C. B., M. A. Dalai, and S. P. Singh., 1978: Genetic Analysis of Field Germination in Soybean. *Theor. Appl. Genet.* **52**, 165-169.
- Torres, M. G., S. Frutos, and J. M. Duran, 1991: Sunflower seed deterioration from exposure to UV-C radiation. *Environ. Exp. Bot.* **31**, 201-207.
- Turhan, H., and I. Baser, 2004: In vitro AND In vivo water stress in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Helia* **27**, 227-236.
- Ujjinaiah, U. S., N. R. Shauthamallaiiah, and W. M. Murali, 1989: Effect of different row spacing and N and P₂O₅ fertilizer levels on growth, yield, yield components and quality of seed in sunflower. *Mysor. J. Agric. Sci.* **23**, 146-850.
- Wang, S. M., and A. H. C. Huang, 1987: Biosynthesis of lipase in the scutellum of maize Kernel. *J. Biol. Chem.* **262**, 2270-2274.
- Wang, S., C. J. Basten, and Z. B. Zeng, 2005: Windows QTL Cartographer 2.5 Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. Citing online sources: advice on online citation formats [online]. Available from <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>.
- Zeng, Z. B., 1993: Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10972–10976.
- Zeng, Z. B., 1994: Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* **136**, 1457–1468.

Figure 1: Graphical genotype and environment biplot based on germination and related traits for 100 sunflower inbred lines. Traits are shown in italics, and genotypes are presented by an open circle “o”. Numbers after trait names: 1.control; 2. PEG treatment. TSG; time to starting germination (h). T50%G; time to 50% germination (h). TMG; time to maximum germination (h). PSG; percentage of seed germination, 1000GW; 1000 grains weight and OC; oil content. Inbred lines: C62, C89, C101, C115 and LR 16a are the best genotypes for germination under control and PEG treatment.

Figure 2. Improved molecular genetic linkage map of sunflower based on 304 AFLP and 191 SSR markers using 100 ‘PAC2 × RHA266’ recombinant inbred lines (RILs). The position of QTLs are presented on the right side of linkage groups. Bars represent intervals associated with the QTLs. The numbers before QTLs name: 1. control; 2. PEG treatment. TSG; time to starting germination (h), T50%G; time to 50% germination (h), TMG; time to maximum germination (h), PSG; percentage of seed germination.

Table 1: Mean squares of analysis of variance for some germination parameters in sunflower inbred lines

	df	TSG	T50%G	TMG	PSG
Drought	1	564696.0**	1270960.1**	2940700.0**	237208.1**
Block	2	338.4	2793.1	6180.2	880.2
Drought× block	2	4259.2***	5088.8***	8058.2***	419.7**
RIL	99	2801.1***	2193.2***	1907.4***	1429.1***
Drought ×RIL	99	2149.6***	1607.6***	1796.8***	922.3***
Error	396	525.8	548.9	685.5	83.0
Total	599				

TSG, time to starting germination (h); T50%G, time to 50% germination (h); TMG, time to maximum germination (h); PSG, percentage of seed germination.

*, **, ***; significant at 0.05, 0.01, and 0.001 probability levels respectively.

Table 2: Genetic variability and genetic gain for germination parameters in control and PEG treatment conditions

Genetic variability	TSG		T50%G		TMG		PSG	
	Control	PEG	Control	PEG	Control	PEG	Control	PEG
PAC2 (P1)	26.0	58.0	29.0	98.0	45.0	186.0	96.7	81.7
RHA266 (P2)	29.0	77.0	29.0	89.0	53.0	143.0	93.3	66.7
P1-P2	-3.0 ^{ns}	-19.0 ^{ns}	0.0 ^{ns}	9.0 ^{ns}	-8.0 ^{ns}	43.0 [*]	3.4 ^{ns}	15.0 [*]
$\bar{X} P = (P1 + P2)/2$	27.5	67.5	29.0	93.0	49.0	164.5	95.0	74.2
MAX RIL	47.0	266.0	64.0	263.0	106.0	282.0	100.0	93.3
MIN RIL	18.0	40.0	20.0	66.0	34.0	114.0	51.7	3.3
\bar{X} RIL	24.2	90.0	33.2	125.8	58.2	198.7	94.3	54.2
10% SRIL	18.3	52.6	23.0	81.0	38.3	148.2	100.0	90.0
GG10%=10%RIL- $\bar{X} P$	-9.2 ^{ns}	-14.9 ^{ns}	-6.0 ^{ns}	-12.0 ^{ns}	-10.7 ^{ns}	-16.3 ^{ns}	5.0 ^{ns}	15.8 [*]

TSG, time to starting germination (h); T50%G, time to 50% germination (h); TMG, time to maximum germination (h); PSG, percentage of seed germination; OC, oil content (%); 1000GW, 1000-grains weight (g)

‘PAC2’ (P1) and ‘RHA266’ (P2): parental lines; $\bar{X} P$: mean of two parental lines; \bar{X} RIL: mean of recombinant inbred lines (RILs); \bar{X} 10%SRIL: the mean of the top 10% selected RILs; GG10%: genetic gain when the mean of the top 10% selected RILs is compared with the mean of the parents.

* Significant at 0.05 probability level; ^{ns}. non-significant.

Table 3: Map position and effect of QTLs detected for germination parameters in sunflower RILs under control and PEG treatment conditions. The numbers before QTL name: 1.control; 2. drought stress (PEG treatment)

Trait	Control							Trait	Drought stress						
	LG	QTL	Marker	Position	LOD	Additive	R ²		LG	QTL	Marker	Position	LOD	Additive	R ²
TSG	7	1.TSG.7.1	E35M60_22	58.7	7.83	-2.51	0.12	TSG	11	2.TSG.11.1	E38M50_24	70.4	7.32	0.23	0.20
	11	1.TSG.11.1	E38M50_15	60.0	4.93	1.70	0.05		14	2.TSG.14.1	E35M61_10	93.1	4.35	0.18	0.12
	14	1.TSG.14.1	SSL33	80.8	5.11	1.86	0.05		15	2.TSG.15.1	HA1837	42.4	5.20	0.22	0.17
	14	1.TSG.14.2	E41M62_9	122.1	4.99	-1.67	0.05		16	2.TSG.16.1	E38M48_13	159.2	5.06	-0.18	0.12
	15	1.TSG.15.1	HA1837	42.4	5.12	0.19	0.09	T50%G	1	2. T50%G.1.1	E40M50_18	18.1	7.69	0.22	0.13
	15	1.TSG.15.2	ORS499	63.5	4.88	-1.81	0.05		2	2. T50%G.2.1	ORS1035	34.6	4.39	0.16	0.07
	16	1.TSG.16.1	ORS333	4.7	5.46	-1.72	0.06		4	2. T50%G.4.1	E41M62_12	44.2	4.59	-0.19	0.07
T50%G	16	1.TSG.16.2	ORS495_2	150.4	4.21	-1.95	0.07		5	2. T50%G.5.1	E41M62_7	0.0	5.58	-0.19	0.09
	3	1. T50%G.3.1	E32M47_13	0.0	4.30	-0.14	0.06		5	2. T50%G.5.2	ORS1024_1	27.3	8.53	0.28	0.17
	4	1.T50%.G.4.1	E41M62_24	75.3	5.42	-0.18	0.09		6	2. T50%.G.6.1	E41M62_11	41.5	5.49	-0.30	0.20
	10	1. T50%G.10.1	E35M60_5	122.0	14.07	-0.29	0.24		11	2.T50%G.11.1	E38M50_24	70.4	4.70	0.20	0.10
	11	1. T50%G.11.1	E38M50_24	70.4	10.23	0.30	0.29	TMG	1	2.TMG.1.1	E38M48_3	23.9	4.09	9.03	0.07
	12	1. T50%.G.12.1	HA3396	62.0	6.03	-0.17	0.09		9	2.TMG.9.1	E33M48_9	66.8	6.36	12.10	0.12
	15	1.T 50%.G.15.1	HA1837	42.4	5.13	0.19	0.09		9	2.TMG.9.2	E33M62_8	81.9	4.13	9.30	0.08
TMG	8	1.TMG.8.1	E37M61_2	22.3	5.01	5.22	0.07	PSG	11	2.TMG.11.1	SSL27	54.3	4.53	-10.80	0.08
	10	1.TMG.10.1	E41M59_11	30.2	4.35	-6.63	0.09		12	2.TMG.12.1	E40M50_9	0.0	4.15	9.82	0.07
	10	1.TM.G10.2	E35M48_8	80.4	5.58	-7.59	0.09		12	2.TMG.12.2	ORS123_3	75.2	4.33	-9.61	0.08
	11	1.TMG.11.1	SSL27	54.3	4.82	5.81	0.10		14	2.TMG.14.1	HA3886	12.4	4.59	11.21	0.10
	11	1.TM.G11.2	E36M59_9	63.1	8.03	7.52	0.16		2	2. PSG .2.1	ORS229	80.1	4.41	7.45	0.06
	12	1.TMG.12.1	SSU41_1	76.7	5.49	-5.57	0.09		3	2. PSG .3.1	HA3938	46.5	4.93	9.56	0.09
	17	1.TMG.17.1	E40M62_16	98.6	5.20	5.85	0.10		4	2. PSG .4.1	ORS671_1	83.8	8.44	12.56	0.17
PSG	4	1.PSG.4.1	ORS671_1	83.8	5.37	0.14	0.09		8	2. PSG .8.1	SSL30	26.8	5.57	-9.26	0.09
	10	1.PSG.10.1	E37M61_6	61.4	7.32	-0.13	0.12		8	2. PSG .8.2	E37M47_19	40.2	7.78	-11.30	0.14
	10	1.PSG.10.2	E33M60_2	135.9	5.14	0.14	0.08		9	2. PSG .9.1	E32M61_6	95.1	4.90	-9.30	0.07
									13	2. PSG .13.1	E38M48_11	88.0	7.89	12.00	0.14
									17	2. PSG .17.1	ORS297	31.2	4.64	-9.70	0.08
									17	2. PSG .17.2	E33M50_4	89.8	4.68	-11.20	0.08
									17	2. PSG .17.3	ORS677	114.0	11.6	19.34	0.24

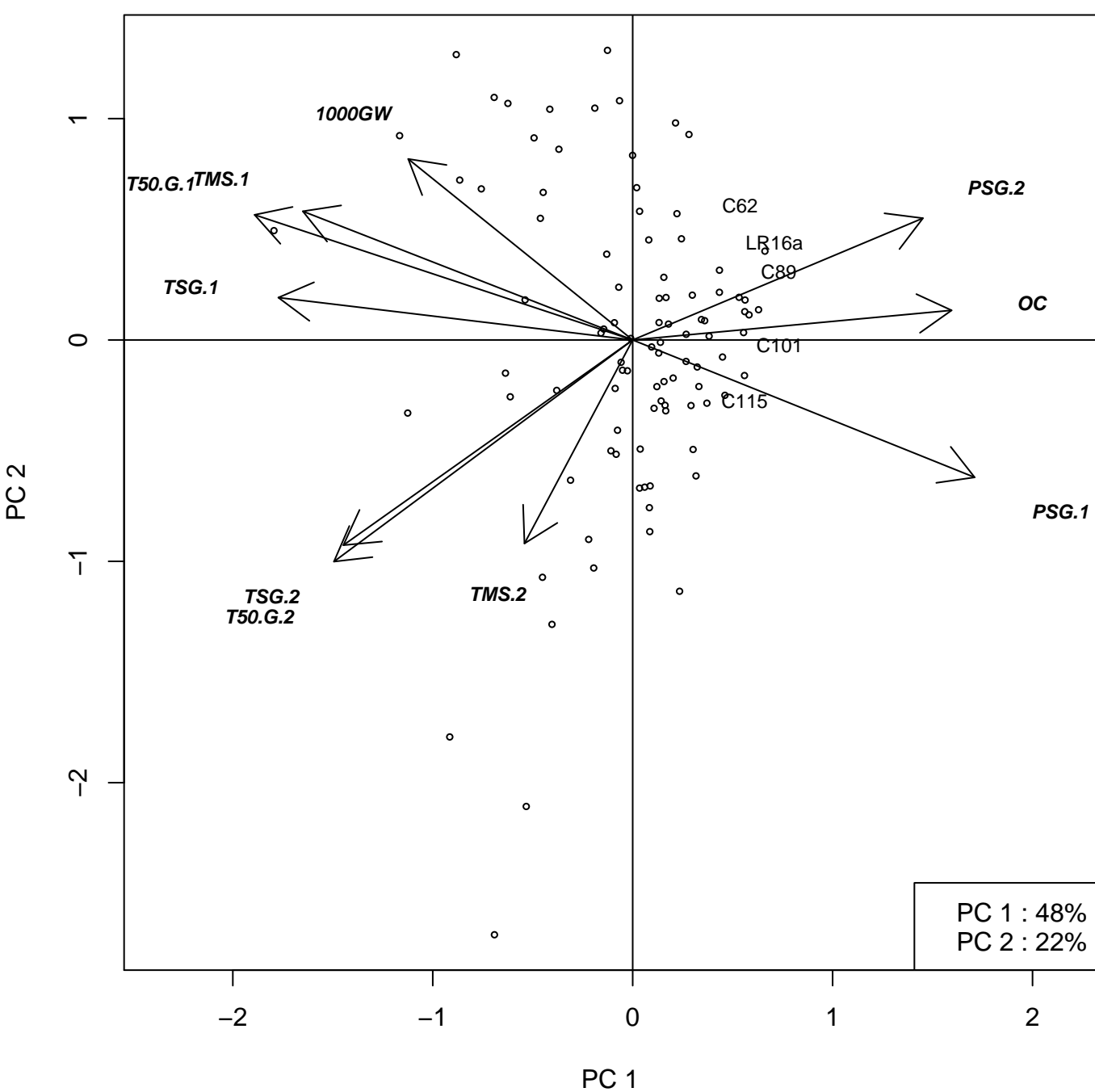
TSG, time to starting germination (h); T50%G, time to 50% germination (h); TMG, time to maximum germination (h); PSG, percentage of seed germination.

Table 4: Number of specific QTL detected for control and drought stress (in the diagonal) as well as non-specific QTLs among control and drought stress conditions for germination traits (above diagonal).

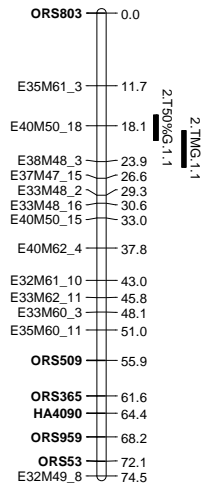
Trait		Conditions	
		Control	Drought stress
TSG	Control	8	2
	Drought stress	0.16 ^{**}	4
T50%G	Control	6	1
	Drought stress	0.19 ^{***}	7
TMG	Control	7	2
	Drought stress	0.02 ^{ns}	6
PSG	Control	3	1
	Drought stress	0.31 ^{***}	10

Correlation coefficients between control and drought stress for different germination traits (TSG; time to starting germination (h). T50%G; time to 50% germination (h). TMG; time to maximum germination (h). PSG; percentage of seed germination.

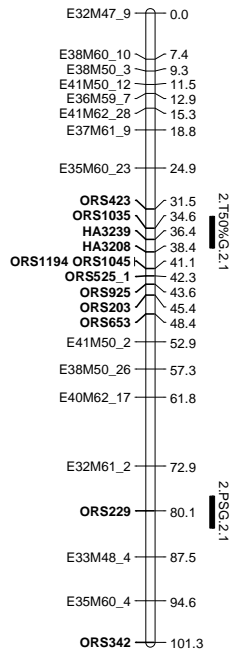
*, **, ***; significant at 0.05. 0.01. 0.001 probability levels respectively. ^{ns}; non significant .



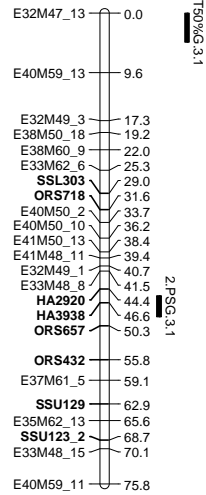
1



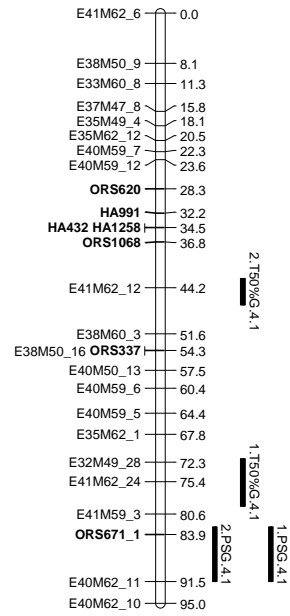
2



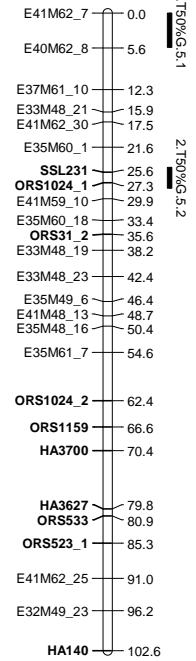
3



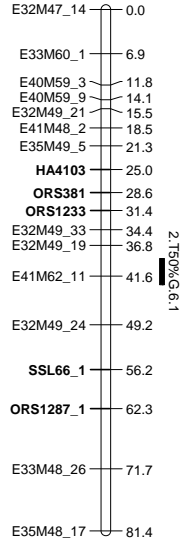
4



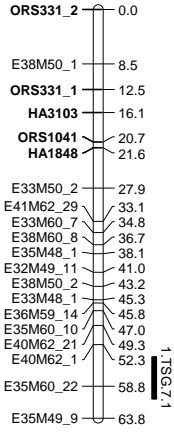
5



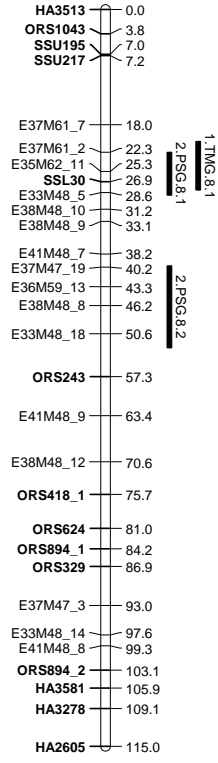
6



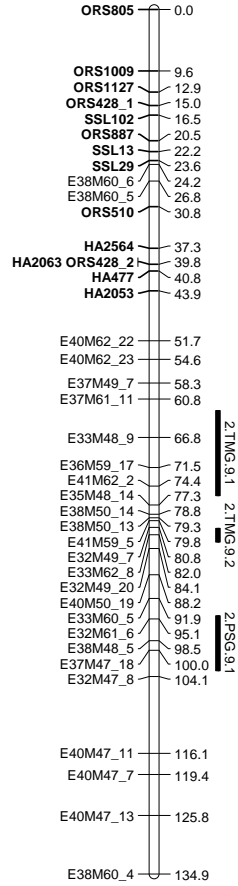
7



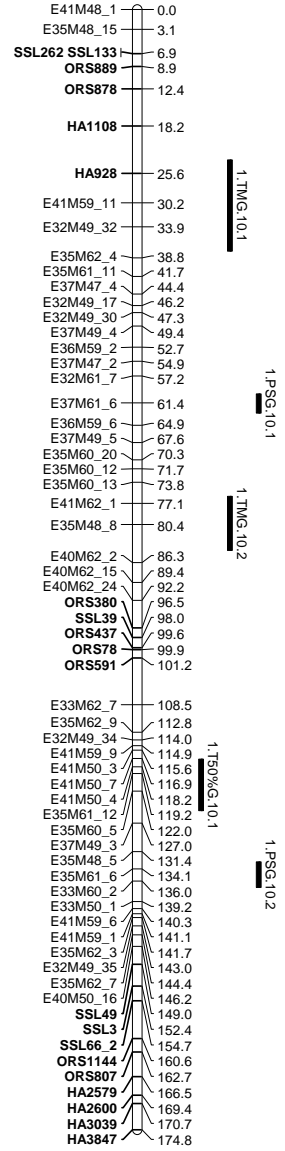
8



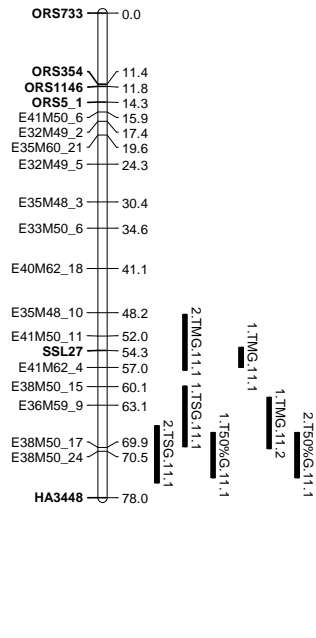
9



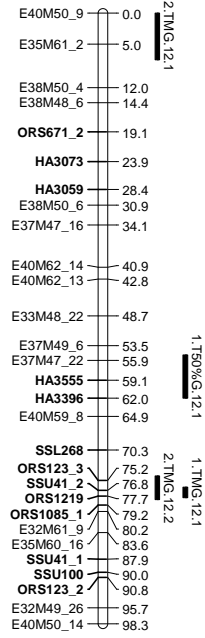
10



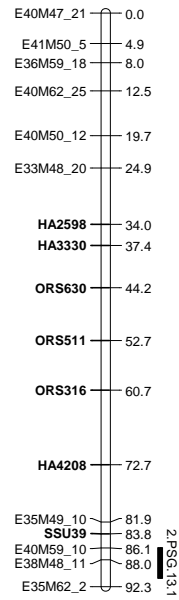
11



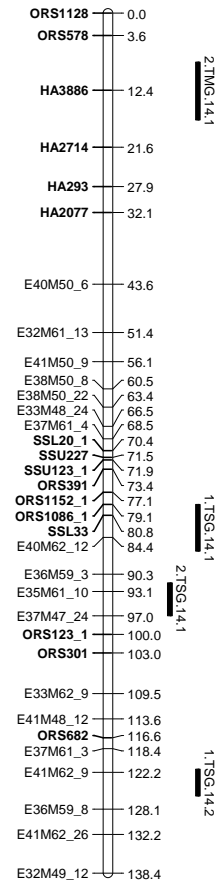
12

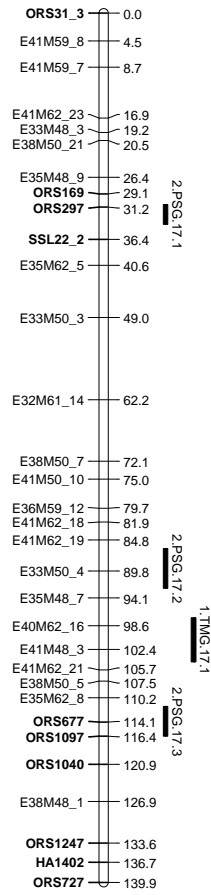
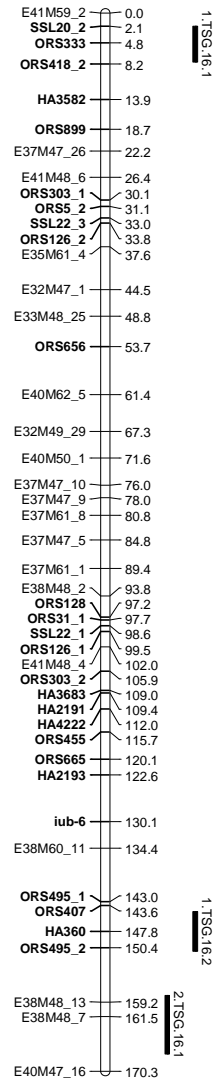
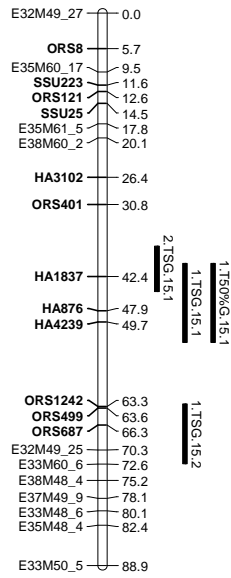


13



14





QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes

A. Ebrahimi, P. Maury, M. Berger, S. Poormohammad Kiani, A. Nabipour, F. Shariati, P. Grieu, and A. Sarrafi

Abstract: The objectives of the present research were to determine the effects of water stress on seed-quality traits and to map QTLs controlling the studied traits under two different water treatments in a population of sunflower recombinant inbred lines (RILs). Two experiments were conducted in greenhouse and field conditions, each with well-watered and water-stressed treatments. The experiments consisted of a split-plot design (water treatment and RIL) with three blocks. Analyses of variance showed significant variation among genotypes, and a water treatment \times genotype interaction was also observed for most of the traits. Two to 15 QTLs were found, depending on trait and growth conditions, and the percentage of phenotypic variance explained by the QTLs ranged from 5% to 31%. Several QTLs for oil content overlapped with QTLs for palmitic and stearic acid contents in all four conditions. An overlapping region on linkage group 3 (QTLs *2.OC.3.1* and *4.SA.3.1*) was linked to an SSR marker (*ORS657*). A principal component analysis was performed on four fatty acid traits. Two principal components, P1 and P2, were used for QTL analysis. This method improved the ability to identify chromosomal regions affecting the fatty acids. We also detected the principal-component QTLs that did not overlap with the fatty acid QTLs. The results highlight genomic regions of interest in marker-based breeding programmes for increasing oil content in sunflower.

Key words: sunflower, QTL, oil content, principal component, fatty acid.

Résumé : Les objectifs de ce travail étaient de déterminer les effets d'un stress hydrique sur la qualité des graines et de cartographier des QTL contrôlant ces caractères sous deux régimes hydriques au sein d'une population de lignées recombinantes fixées (« RIL ») de tournesol. Deux expériences ont été réalisées dans des serres et au champ avec, dans chaque cas, un traitement sans et un autre avec stress hydrique. Un dispositif expérimental en tiroirs (« split-plot », régime hydrique et RIL) avec trois répétitions a été employé. L'analyse de variance a montré une variation significative parmi les génotypes ainsi qu'une interaction régime hydrique \times génotype significative pour la plupart des caractères à l'étude. Entre 2 et 15 QTL ont été identifiés selon le caractère et les conditions de croissance. La part de la variance phénotypique expliquée par ces QTL variait entre 5 et 31 %. Plusieurs QTL ont été trouvés pour la teneur en huile, lesquels coïncidaient avec des QTL pour la teneur en acides palmitique et stéarique dans les quatre conditions. Une de ces régions de colocalisation de QTL sur le groupe de liaison 3 (*2.OC.3.1* et *4.SA.3.1*) était liée à un microsatellite (*ORS657*). Une analyse en composantes principales (« PCA ») a été réalisée sur quatre caractères relatifs aux acides gras. Deux composantes principales, P1 et P2, ont été employées lors d'une analyse QTL. Cette méthode a accru la capacité d'identifier des régions chromosomiques contrôlant les acides gras. Des QTL-PCA qui ne coïncidaient pas avec des QTL pour les acides gras ont également été détectés. L'ensemble des résultats met en lumière des régions génomiques pouvant servir en sélection assistée par marqueurs pour accroître la teneur en huile chez le tournesol.

Mots-clés : tournesol, QTL, teneur en huile, composante principale, acide gras.

[Traduit par la Rédaction]

Received 11 December 2007. Accepted 20 April 2008. Published on the NRC Research Press Web site at genome.nrc.ca on 22 July 2008.

Corresponding Editor: F. Belzile.

A. Ebrahimi. INP-ENSAT, IFR 40, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, F-31326 Castanet Tolosan, France; INP-ENSAT, INRA, UMR 1248, Agrosystèmes et Développement Territorial, F-31326 Castanet Tolosan, France.

P. Maury and P. Grieu.¹ INP-ENSAT, INRA, UMR 1248, Agrosystèmes et Développement Territorial, F-31326 Castanet Tolosan, France.

M. Berger. UMR INRA/ESAP 1054, Laboratoire d'agrophysiologie, Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan, 31076 Toulouse CEDEX 03, France.

S. Poormohammad Kiani and A. Sarrafi.^{1,2} INP-ENSAT, IFR 40, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, F-31326 Castanet Tolosan, France.

A. Nabipour and F. Shariati. Department of Oilseed Crops Breeding, Seed and Plant Improvement Institute, Mahdasht Avenue, Karaj, Iran.

¹Ph.D. supervisors of the first author.

²Corresponding author (e-mail: sarrafi@ensat.fr).

Introduction

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the four major annual world crops planted for edible oil. In commonly grown sunflower cultivars, the oil contains a high proportion (about 90%) of unsaturated fatty acids: oleic (C18:1) and linoleic (C18:2) acids. The remaining 10% corresponds to the saturated fatty acids palmitic (C16:0) and stearic (C18:0) acids (Garcés et al. 1989). Unsaturated fatty acids are generally considered to be healthier than saturated fatty acids (Murphy 1994). Polyunsaturated acids, such as linoleic acid, are essential to mammals and have a potent hypocholesterolemic effect (Kris-Etherton and Yu 1997). On the other hand, high levels of saturated fatty acids are desired for the margarine and related industries for the development of solid or semisolid fats without chemical processes such as hydrogenation or transesterification (Ascherio and Willett 1997). Fatty acid and yield breeding programs have led to improved sunflower genotypes with higher yield and quality.

Oil content heritability is rather high, and has been estimated to be 0.65–0.70 by Fick (1975) and 0.57 by Mokrani et al. (2002). Mokrani et al. (2002) reported that genetic gain (the difference between the best parents and the mean of 10% of selected RILs) is significant for oil content.

Al-Chaarani et al. (2004) observed a nonsignificant correlation between sowing to flowering time and oil content. In contrast, Leon et al. (2003) reported a significant negative correlation between days to flowering and seed-oil concentration in areas with short growing seasons (Fargo), and they also detected two QTLs that were associated with both seed-oil concentration and days to flowering. The additive effects for high values of days to flowering and lower values of seed-oil concentration were derived from only one parent (ZENB8), suggesting a negative phenotypic correlation between these traits. This phenomenon probably caused the sudden interruption of seed filling, so these QTLs were associated with factors controlling days to flowering and not oil concentration directly (Leon et al. 2001).

The first genetic studies of high oleic acid (OA) genotypes showed that a single partially dominant (Fick 1984) or dominant (Urie 1984) gene, designated *Ol*, controls high OA content in sunflower seeds. However, a second locus, *MI*, whose recessive alleles (*mlml*) are necessary for the expression of the high OA content, has also been described (Miller et al. 1987). Fernández-Martínez et al. (1989) reported the existence of 3 complementary genes (*Ol₁*, *Ol₂*, and *Ol₃*) controlling high seed OA content. Studies of high stearic acid (SA) mutants led to a three-locus model. The *Es1* locus, with a partial dominance effect of low over high SA content, was completed with a second independent locus, *Es2*, also with a partial dominance effect (Pérez-Vich et al. 2002b). The contribution of *es1* and *es2* alleles to the high SA phenotype is about 18.8% and 9.0%, respectively, in homozygous genotypes (Pérez-Vich et al. 2004a). A third recessive locus, *es3*, is also responsible for high SA content, but it is strongly influenced by the temperature during seed maturation, and displays interaction with *es1* (Pérez-Vich et al. 2006). Studies of high palmitic acid (PA) have shown that this trait is controlled by three independent, partially recessive, and gametophytic genes (Pérez-Vich et al. 2002a).

Oleic acid is produced from stearic acid by stearyl-acyl

Table 1. Mean squares of analysis of variance for seed-quality traits in recombinant inbred lines (RILs) of sunflower.

	df		OC ^a		PA ^b		SA ^b		OA ^b		LA ^b	
	Greenhouse	Field	Greenhouse	Field	Greenhouse	Field	Greenhouse	Field	Greenhouse	Field	Greenhouse	Field
Water treatment	1	1	0.66	22.76	1.01	0.84*	12.15*	1.58	1138.05*	155.70	203.08	162.69
Block	2	2	2.78	14.19	1.40	0.06	0.31	0.83	20.88	57.09	24.55	58.03
Block × water treatment	2	2	1.59	11.40	0.37	0.03	0.66	1.45**	14.26	45.82*	17.32	31.07
Genotype (RIL)	71	98	44.06***	79.47***	2.22***	1.37***	3.06***	2.16***	407.34***	179.35***	377.62***	177.83***
RIL × water treatment	71	98	11.91***	8.29	1.36***	0.10	0.75***	0.25	49.01***	15.16	55.27***	16.22*
Error	284	392	5.48	7.61	0.50	0.08	0.24	0.20	22.31	12.37	24.03	12.55
Total	431	593										

Note: OC, oil content; PA, palmitic acid content; SA, stearic acid content; OA, oleic acid content; LA, linoleic acid content. *, **, and ***, significant at probability levels of 0.05, 0.01, and 0.001, respectively.

^a% of grain.

^b% of oil.

Table 2. Genetic variability and genetic gain for seed-quality traits in sunflower under well-watered (WW) and water-stressed (WS) conditions in the field and the greenhouse.

	OC ^a				PA ^b				SA ^b			
	Greenhouse		Field		Greenhouse		Field		Greenhouse		Field	
	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS
Mean of PAC2 (PL1)	43.79	46.05	39.74	42.64	5.12	5.22	5.23	5.35	3.73	3.59	4.61	4.68
Mean of RHA266 (PL2)	43.64	44.63	42.43	42.56	5.13	5.55	4.35	4.63	3.80	4.32	4.94	5.05
Difference between parents (PL1 – PL2)	0.15ns	1.42ns	–2.69ns	0.08ns	–0.01ns	–0.33ns	0.88ns	0.72ns	–0.07ns	–0.73ns	–0.33ns	–0.37ns
Mean of two parents ($\bar{X}_P = (PL1 + PL2)/2$)	43.71	45.34	41.08	42.60	5.13	5.39	4.79	4.99	3.77	3.96	4.77	4.87
Mean of RILs (\bar{X}_{RIL})	43.05	42.97	41.06	40.66	5.07	4.97	5.26	5.18	4.19	4.52	4.44	4.54
Difference between RILs and parents ($\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$)	–0.66ns	–2.37ns	–0.02ns	–1.94ns	–0.06ns	–0.42ns	0.47*	0.19ns	0.42ns	0.57ns	–0.33ns	–0.32ns
Mean of top 10% of selected RILs ($\bar{X}_{10\%SRIL}$)	48.02	47.68	48.31	47.61	5.83	6.37	6.00	5.95	5.50	6.11	5.60	5.73
Genetic gain ($\bar{X}_{10\%SRIL} - \bar{X}_P$)	4.31*	2.34	7.23*	5.01*	0.70	0.99	1.21*	0.96*	1.73*	2.16*	0.83*	0.87*

Table 2. (concluded).

	OA ^b				LA ^b			
	Greenhouse		Field		Greenhouse		Field	
	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS
Mean of PAC2 (PL1)	43.90	43.82	45.14	42.66	47.14	46.64	44.71	47.41
Mean of RHA266 (PL2)	54.92	61.23	46.91	45.21	35.92	29.50	42.19	44.87
Difference between parents (PL1 – PL2)	–11.02ns	–17.41*	–1.77ns	–2.55ns	11.22ns	17.14*	2.52ns	2.54ns
Mean of two parents ($\bar{X}_P = (PL1 + PL2)/2$)	49.41	52.52	46.03	43.94	41.53	38.07	43.45	46.14
Mean of RILs (\bar{X}_{RIL})	49.60	46.36	42.23	43.26	40.98	42.35	47.31	46.26
Difference between RILs and parents ($\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$)	0.19ns	–6.17ns	–3.79ns	–0.68ns	–0.55ns	4.28ns	3.86ns	0.12ns
Mean of top 10% of selected RILs ($\bar{X}_{10\%SRIL}$)	62.03	60.63	54.12	55.05	54.82	59.62	57.69	56.37
Genetic gain ($\bar{X}_{10\%SRIL} - \bar{X}_P$)	12.62*	8.11*	8.10*	11.12*	13.29*	21.55*	14.24*	10.23*

Note: OC, oil content; PA, palmitic acid content; SA, stearic acid content; OA, oleic acid content; LA, linoleic acid content. PAC2 (PL1) and RHA266 (PL2), parental lines; RILs, recombinant inbred lines. *, significant at a probability level of 0.05; ns, nonsignificant.

^a% of grain.

^b% of oil.

Table 3. Correlation between seed-quality traits in sunflower under well-watered greenhouse (1), water-stressed greenhouse (2), well-watered field (3), and water-stressed field conditions (4).

Trait	Condition	OC	PA	SA	OA
PA	1	0.15*			
	2	-0.04			
	3	0.58***			
	4	0.65***			
SA	1	-0.33***	-0.10		
	2	-0.30***	-0.11		
	3	-0.40***	-0.22***		
	4	-0.40***	-0.30***		
OA	1	-0.02	-0.44***	-0.04	
	2	-0.10	-0.33***	0.20**	
	3	-0.50***	-0.60***	0.26***	
	4	-0.60***	-0.70***	0.31***	
LA	1	0.07	0.49***	-0.10	-0.98***
	2	0.10	0.51***	-0.23***	-0.97***
	3	0.51***	0.63***	-0.30***	-0.98***
	4	0.57***	0.67***	-0.40***	-0.98***

Note: OC, oil content; PA, palmitic acid content; SA, stearic acid content; OA, oleic acid content; LA, linoleic acid content. *, **, and ***, significant at probability levels of 0.05, 0.01, and 0.001, respectively.

carrier protein Δ^9 -desaturase (EC 1.14.19.2) and subsequently desaturated into linoleic acid by oleoyl-phosphatidyl choline Δ^{12} -desaturase (FAD2) (EC 1.3.1.35). Genes encoding FAD2 are logical candidates for the *Ol* mutation. Among the three FAD2 genes identified in sunflower (Hongtrakul et al. 1998; Martinez-Rivas et al. 2001), *FAD2-1* is seed-specific and strongly expressed in developing seeds. Hongtrakul et al. (1998) discovered that *FAD2-1* was duplicated and very weakly expressed in mutant lines homozygous for the *Ol* mutation. Furthermore, *FAD2-1* has been shown to co-segregate with *Ol* and has been mapped to linkage group (LG) 14 (Lacombe and Berville 2001; Pérez-Vich et al. 2002b; Schuppert et al. 2006).

Pérez-Vich et al. (2002b) detected two major QTLs for SA and OA content on LG1 and LG14, corresponding to stearoyl-ACP desaturase and oleoyl-PC desaturase loci, which co-segregate with the major genes *Es1* and *Ol*, respectively. The first QTL explained around 80% of the phenotypic variance of SA content (Pérez-Vich et al. 2002b). Pérez-Vich et al. (2004b) also identified three other minor QTLs affecting SA content on LG3, LG11, and LG13. In total, these QTLs explained 43.6% of the phenotypic variance of SA content. Another locus influencing SA content, *Es3*, was mapped on LG8 (Pérez-Vich et al. 2006), but *Es2* and the three *p* loci affecting PA content have not yet been located. The inheritance of high OA appears rather complex and displays interaction with high SA. Pérez-Vich et al. (2000) suggested a genetic linkage between *Es2* and the *Ol* alleles. However, high PA and high OA are independently inherited (Pérez-Vich et al. 2002a).

Sunflower seed composition is largely influenced by environmental factors, such as water availability. For instance, OA content can be strongly influenced by environment (Harwood 1996). Severe water deficit during the reproductive stages decreases the oil content in sunflower (Muriel and Downes 1974; Nel et al. 2002). Water deficit from sowing to the end of anthesis modifies the fatty acid composition

of standard hybrids (Roche et al. 2006). Severe water deficit during seed filling decreases OA by 10%–16%, with a concomitant increase of linoleic acid (LA), in standard hybrids of sunflower (Roche et al. 2006). On the contrary, Flagella et al. (2002) observed a decrease of OA under irrigation, and Baldini et al. (2002) observed an increase of OA when water stress was applied during seed filling. Drought stress can increase OA content in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) as well (Dwivedi et al. 1996).

Water stress significantly reduces dry matter and oil accumulation phases by accelerating embryo development and lipid accumulation. Therefore, reducing the duration of all enzyme activities, including that of oleoyl-PC desaturase, could modify the fatty acid composition, particularly the OA/LA ratio (Baldini et al. 2002).

The objective of this research was to investigate the genetic determinism of sunflower seed quality under water stress. For this aim, genetic variability for oil content and fatty acid composition was investigated in recombinant inbred lines in well-watered and water-stressed conditions. Comparisons were also made between QTLs controlling these characters in these two conditions.

Materials and methods

Plant material and experimental conditions

The recombinant inbred lines (RILs) used in this study were developed through single seed descent from F₂ plants derived from a cross between PAC2 and RHA266, inbred lines from INRA-France and USDA, respectively. Our experiments were performed in two environments: the greenhouse and the field.

Greenhouse experiment

Seventy-two RILs and their parents (PAC2 and RHA266) were grown in a greenhouse in plastic pots containing a mixture of 40% soil, 40% compost, and 20% sand. Temper-

Table 4. Map position and effect of QTLs for oil content, palmitic acid content, stearic acid content, oleic acid content, and linoleic acid content, detected in RILs in the greenhouse under well-watered and water-stressed conditions.

	QTL	Marker	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²
Oil content						
Well-watered	1.OC.1.1	ORS959	68.2	4.58	−0.845	0.06
	1.OC.2.1	ORS525_1	42.3	8.74	1.599	0.14
	1.OC.6.1	E33M60_1	6.9	8.24	1.118	0.11
	1.OC.6.2	E35M49_5	21.3	6.36	1.116	0.11
	1.OC.7.1	HA1848	21.6	4.97	0.944	0.07
	1.OC.7.2	E33M50_2	27.9	5.12	0.892	0.07
	1.OC.10.1	E41M50_4	118.2	10.30	1.577	0.14
	1.OC.12.1	E37M49_6	53.5	5.12	−0.841	0.06
	1.OC.14.1	ORS123_1	100.0	6.56	1.031	0.10
	1.OC.14.2	E41M48_12	113.6	10.58	1.253	0.15
	1.OC.14.3	E41M62_9	122.2	4.66	0.977	0.09
	1.OC.16.1	E41M48_6	26.4	9.75	−1.275	0.16
Water-stressed	2.OC.2.1	ORS203	45.4	8.85	1.396	0.14
	2.OC.3.1	ORS657	50.3	7.79	−1.225	0.12
	2.OC.6.1	E32M49_19	36.8	6.91	1.412	0.15
	2.OC.8.1	E37M47_3	93.0	6.93	1.179	0.09
	2.OC.10.1	E35M61_12	119.2	8.73	1.903	0.13
	2.OC.11.1	E33M50_6	34.6	4.85	0.949	0.06
	2.OC.16.1	ORS418_2	8.2	6.69	−1.178	0.10
	2.OC.16.2	ORS407	143.6	7.12	1.114	0.11
Palmitic acid content						
Well-watered	1.PA.1.1	E35M60_11	51.0	6.92	−0.319	0.23
	1.PA.2.1	E38M60_10	7.4	4.93	−0.216	0.10
	1.PA.3.1	E38M50_18	19.2	5.98	0.210	0.11
	1.PA.10.1	E35M61_12	119.2	4.45	0.233	0.09
	1.PA.10.2	E33M60_2	136.0	5.80	0.242	0.11
	1.PA.15.1	E33M60_6	72.6	4.74	−0.188	0.08
Water-stressed	2.PA.2.1	E35M60_4	94.6	9.92	0.391	0.11
	2.PA.3.1	E38M50_18	19.2	6.10	0.260	0.05
	2.PA.5.1	E41M48_13	48.7	9.90	−0.425	0.14
	2.PA.6.1	E32M47_14	0.0	9.17	0.491	0.14
	2.PA.6.2	E35M49_5	21.3	11.26	0.470	0.13
	2.PA.7.1	ORS331_1	12.5	11.98	−0.438	0.13
	2.PA.8.1	E38M48_10	31.2	13.04	0.436	0.15
	2.PA.8.2	ORS329	86.9	5.13	0.279	0.05
	2.PA.9.1	HA2564	37.3	5.51	0.271	0.05
	2.PA.12.1	ORS123_3	75.2	5.92	−0.263	0.05
	2.PA.14.1	SSL33	80.8	14.96	0.513	0.18
	2.PA.14.2	E37M47_24	97.0	8.50	0.492	0.17
	2.PA.16.1	E37M47_5	84.8	4.84	0.374	0.10
	2.PA.16.2	E41M48_4	99.5	12.59	0.444	0.14
	2.PA.17.1	ORS1247	133.6	5.22	0.287	0.06
Stearic acid content						
Well-watered	1.SA.2.1	E41M62_28	15.3	5.78	0.436	0.10
	1.SA.2.2	HA3239	36.4	8.65	−0.593	0.22
	1.SA.12.1	ORS671_2	19.1	5.64	0.371	0.14
	1.SA.12.2	E37M47_16	34.1	7.23	0.443	0.20
	1.SA.14.1	HA3886	12.4	7.66	−0.435	0.17
Water-stressed	2.SA.6.1	E35M49_5	21.3	4.11	−0.200	0.05
	2.SA.6.2	E41M62_11	41.6	4.37	−0.340	0.13
	2.SA.7.1	E33M50_2	27.9	11.22	−0.406	0.20
	2.SA.8.1	SSU217	7.2	9.20	−0.376	0.13
	2.SA.8.2	E37M47_3	93.0	4.54	−0.234	0.06

Table 4 (concluded).

	QTL	Marker	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²
	2.SA.11.1	E35M48_10	48.2	5.23	-0.282	0.10
	2.SA.12.1	E35M61_2	5.0	9.79	0.338	0.14
	2.SA.12.2	ORS671_2	19.1	4.29	0.270	0.07
	2.SA.14.1	HA293	27.9	8.06	-0.351	0.13
Oleic acid content						
Well-watered	1.OA.1.1	ORS959	68.2	4.02	2.159	0.06
	1.OA.3.1	E35M62_13	65.6	15.44	6.160	0.31
	1.OA.4.1	ORS337	54.3	6.11	-3.050	0.10
	1.OA.5.1	SSL231	25.6	5.16	-2.753	0.09
	1.OA.7.1	E36M59_14	45.8	5.29	-2.367	0.07
	1.OA.8.1	SSU217	7.2	4.77	-2.546	0.06
	1.OA.8.2	E38M48_9	33.1	5.26	2.729	0.09
	1.OA.9.1	E38M48_5	98.5	7.24	-3.197	0.11
Water-stressed	1.OA.15.1	E38M48_4	75.2	5.85	2.784	0.08
	2.OA.3.1	E35M62_13	65.6	9.54	5.243	0.22
	2.OA.4.1	E40M59_5	64.4	5.61	-3.797	0.11
	2.OA.8.1	SSU217	7.2	6.21	-4.122	0.10
	2.OA.9.1	ORS805	0.0	7.51	-4.198	0.17
	2.OA.11.1	E35M48_10	48.2	5.50	-4.776	0.13
	2.OA.15.1	E38M48_4	75.2	5.46	3.185	0.09
Linoleic acid content						
Well-watered	1.LA.3.1	E35M62_13	65.6	11.83	-8.608	0.28
	1.LA.4.1	E40M59_12	23.6	4.89	5.072	0.13
	1.LA.8.1	SSU217	7.2	7.80	4.067	0.16
	1.LA.15.1	E37M49_9	78.1	9.53	-4.109	0.21
Water-stressed	2.LA.3.1	E35M62_13	65.6	12.18	-5.677	0.27
	2.LA.4.1	ORS337	54.3	9.07	5.037	0.20
	2.LA.13.1	E40M62_25	12.5	4.80	6.833	0.22
	2.LA.13.2	E33M48_20	24.9	7.37	4.666	0.20
	2.LA.15.1	E32M49_25	70.3	6.59	-3.756	0.13
	2.LA.16.1	E41M59_2	0.0	5.00	2.930	0.08

Note: QTLs are named as follows: a number indicating the conditions (1, well-watered greenhouse; 2, water-stressed greenhouse), followed by an abbreviation for the trait, the corresponding linkage group, and the number of QTLs in the linkage group. R², proportion of individual phenotypic variance explained by the QTL.

ature was controlled at $25/18 \pm 2$ °C (day/night), relative humidity was $65/85 \pm 5\%$ (day/night), and light was provided to obtain a 16 h light period. The experiment consisted of a split-plot design with 3 blocks. The main plot was water treatment (well-watered and water-stressed) and the subplot was genotype (RILs and their parents). The RILs and their parents were randomized within each treatment-block combination. To simulate water deficit conditions similar to those in the field, a progressive water stress was imposed at the stage near flower bud formation (R1, Schneiter and Miller 1981) by progressively decreasing the irrigation to 30% of field capacity during 12 days. Water-stressed plants were then irrigated at 30% of field capacity until harvest. Well-watered (control) plants received sufficient water to maintain soil water content close to field capacity. Both well-watered and water-stressed plants were weighed to maintain the desired soil water content.

Field experiment

Ninety-seven RILs and their parents (PAC2 and RHA266) were grown in the field under both irrigated and

non-irrigated (rainfall) treatments. In each water treatment, 3 replications were designed and each replication consisted of 2 rows, each 4.6 m long, with 50 cm between rows and 25 cm between plants in a row. Thirty-two plants were obtained per plot. Plants in the well-watered treatment were irrigated two times, at two critical stages: before flowering and during grain filling (determined according to the sunflower irrigation programme in the Toulouse region, France). Plants in the water-stress treatment were not irrigated at all. Four plants per genotype per water treatment per replication were randomly chosen for our studies.

Trait measurements

For each genotype in each replication of each water treatment, a sample of 40 g of sunflower seeds was ground in a Knifetec 1095 Sample Mill (FOSS, Höganäs, Sweden) 3 times for 10 s each. No sample material adhered to the walls of the mill because the sample was mixed at each interval. A FOSS NIRSystems 6500 spectrophotometer (FOSS Analytical, Denmark) was used to collect spectra from the milled sunflower seed samples using a small round cup

Table 5. Map position and effect of QTLs for oil content, palmitic acid content, stearic acid content, oleic acid content, and linoleic acid content, detected in RILs in the field under well-watered and water-stressed conditions.

	QTL	Marker	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²
Oil content						
Well-watered	3.OC.1.1	E33M48_2	29.3	7.78	-1.698	0.14
	3.OC.10.1	E37M47_2	54.9	7.83	-2.376	0.12
	3.OC.10.2	E41M50_3	115.6	5.71	2.376	0.09
	3.OC.12.1	HA3555	59.1	5.71	1.335	0.09
	3.OC.16.1	ORS418_2	8.2	4.29	1.096	0.07
	3.OC.17.1	E41M59_8	4.5	9.14	1.662	0.15
Water-stressed	4.OC.2.1	HA3239	36.4	5.86	1.469	0.11
	4.OC.10.1	E35M48_8	80.4	7.93	1.709	0.15
	4.OC.16.1	ORS418_2	8.2	4.74	1.237	0.08
Palmitic acid content						
Well-watered	3.PA.9.1	ORS887	20.5	7.14	-15.810	0.13
	3.PA.12.1	E38M50_6	30.9	5.56	15.224	0.09
	3.PA.13.1	ORS316	60.7	5.25	-15.240	0.12
	3.PA.16.1	HA2193	122.6	4.07	12.363	0.08
Water-stressed	4.PA.1.1	HA4090	64.4	7.24	-17.800	0.16
	4.PA.4.1	E40M59_12	23.6	8.20	-19.400	0.17
	4.PA.7.1	E32M49_11	41.0	6.99	20.090	0.23
	4.PA.8.1	SSL30	26.9	7.44	19.380	0.13
	4.PA.8.2	ORS243	57.3	7.97	-21.400	0.15
Stearic acid content						
Well-watered	3.SA.5.1	E41M62_7	0	6.07	0.279	0.13
	3.SA.10.1	E35M48_8	80.4	5.43	-0.284	0.12
	3.SA.14.1	HA293	27.9	4.88	-0.248	0.12
	3.SA.15.1	ORS401	30.8	5.55	0.273	0.14
	3.SA.16.1	E38M60_11	134.4	5.85	-0.280	0.16
Water-stressed	4.SA.1.1	E33M60_3	48.1	7.72	0.366	0.15
	4.SA.3.1	ORS657	50.3	9.51	-0.350	0.18
	4.SA.6.1	E35M49_5	21.3	4.28	-0.200	0.07
	4.SA.10.1	E35M48_8	80.4	6.02	-0.260	0.10
	4.SA.12.1	ORS671_2	19.1	4.48	0.207	0.07
	4.SA.14.1	HA293	27.9	6.81	-0.280	0.13
Oleic acid content						
Well-watered	3.OA.3.1	E38M50_18	19.2	5.03	-1.937	0.09
	3.OA.15.1	HA4239	49.7	6.33	2.724	0.13
	3.OA.16.1	ORS333	4.8	4.61	-2.275	0.09
Water-stressed	4.OA.7.1	E36M59_14	45.8	4.42	-1.630	0.07
	4.OA.13.1	HA4208	72.7	9.17	2.723	0.17
Linoleic acid content						
Well-watered	3.LA.17.1	ORS297	31.2	4.78	-2.161	0.09
	3.LA.17.2	E35M48_7	94.1	9.10	2.682	0.17
Water-stressed	4.LA.7.1	E38M50_2	43.2	4.28	2.530	0.16
	4.LA.13.1	ORS316	60.7	5.67	-2.380	0.14

Note: QTLs are named as follows: a number indicating the conditions (3, well-watered field; 4, water-stressed field), followed by an abbreviation for the trait, the corresponding linkage group, and the number of QTLs in the linkage group. R², proportion of individual phenotypic variance explained by the QTL.

with a quartz window. Oil content (OC) as well as PA, SA, OA, and LA contents were measured by the FOSS NIRSystems 6500 as reported by Ayerdi Gotor et al. (2007).

Data analysis and QTL mapping

The data were analyzed using SAS PROC GLM (SAS Institute Inc. 1996). A mixed model with water treatment as

fixed effect and genotype (RILs and parents) as random effect was used for analysis of the data in the two conditions (greenhouse and field). Phenotypic correlations between traits in each water treatment were determined using SAS PROC CORR. A multivariate analysis by SAS PROC PRINCOMP was applied for fatty acid traits. First (P1) and second (P2) principal components accounting for almost 90%

Table 6. Parameters associated with QTLs for the first two principal components (P1 and P2) derived from all four traits (PA, SA, OA, and LA).

	QTL	Marker	Position (cM)	LOD	Additive effect	R^2
Greenhouse						
Well-watered						
P1	1.P1.3.1	E35M62_13	65.6	12.15	-6.81	0.23
	1.P1.4.1	ORS337	54.3	6.81	5.69	0.15
	1.P1.7.1	E38M50_2	43.2	5.51	3.56	0.13
	1.P1.8.1	SSU217	7.2	6.11	3.72	0.09
	1.P1.9.1	E38M48_5	98.5	9.62	4.85	0.17
	1.P1.15.1	E38M48_4	75.2	6.89	-3.58	0.11
P2	1.P2.3.1	E32M47_13	0.0	9.74	-0.86	0.21
	1.P2.7.1	ORS331_2	0.0	4.51	0.63	0.08
	1.P2.7.2	E36M59_14	45.8	4.75	0.50	0.08
	1.P2.10.1	HA3039	170.7	6.78	-0.79	0.17
Water-stressed						
P1	2.P1.3.1	E38M50_18	19.2	4.99	3.46	0.07
	2.P1.3.2	E35M62_13	65.6	11.59	-6.12	0.22
	2.P1.4.1	ORS337	54.3	9.00	6.12	0.20
	2.P1.13.1	E33M48_20	24.9	8.40	5.38	0.17
	2.P1.15.1	E33M60_6	72.6	4.24	-3.39	0.07
	2.P2.3.1	E38M50_18	19.2	8.94	0.80	0.14
P2	2.P2.3.2	E35M62_13	65.6	10.69	-0.97	0.18
	2.P2.11.1	E40M62_18	41.1	4.16	1.00	0.17
	2.P2.11.2	E36M59_9	63.1	4.21	0.62	0.07
	2.P2.13.1	E33M48_20	24.9	8.18	0.90	0.16
	2.P2.15.1	E33M60_6	72.6	5.19	-0.62	0.07
	2.P2.17.1	E41M59_7	8.7	5.88	0.61	0.08
Field						
Well-watered						
P1	3.P1.1.1	ORS803	0.0	4.84	-7.05	0.08
	3.P1.5.1	E41M59_10	29.9	7.36	13.55	0.15
	3.P1.10.1	E37M47_2	54.9	8.72	-16.36	0.16
	3.P1.10.2	E35M61_12	119.2	4.68	11.32	0.07
	3.P1.13.1	ORS316	60.7	6.05	-9.37	0.11
	3.P2.1.1	ORS803	0.0	4.24	-2.37	0.08
P2	3.P2.5.1	E41M59_10	29.9	4.84	3.63	0.12
	3.P2.10.1	E37M47_2	54.9	4.14	-3.91	0.07
	3.P2.10.2	E35M61_12	119.2	4.58	3.64	0.07
	3.P2.13.1	ORS316	60.7	6.23	-3.15	0.12
	4.P1.5.1	E41M59_10	29.9	7.10	14.43	0.14
Water-stressed						
P1	4.P1.10.1	E35M61_12	119.2	4.82	13.63	0.10
	4.P1.13.1	ORS316	60.7	7.90	-12.43	0.21
	4.P2.1.1	ORS803	0.0	4.17	-3.01	0.08
P2	4.P2.1.2	HA4090	64.4	4.08	-2.92	0.08
	4.P2.7.1	E32M49_11	41.0	7.49	6.35	0.32
	4.P2.8.1	ORS243	57.3	6.31	-4.14	0.11
	4.P2.8.2	E41M48_9	63.4	4.23	-3.64	0.12
	4.P2.10.1	HA928	25.6	4.85	3.26	0.09
	4.P2.17.1	HA1402	136.7	5.22	-3.88	0.11

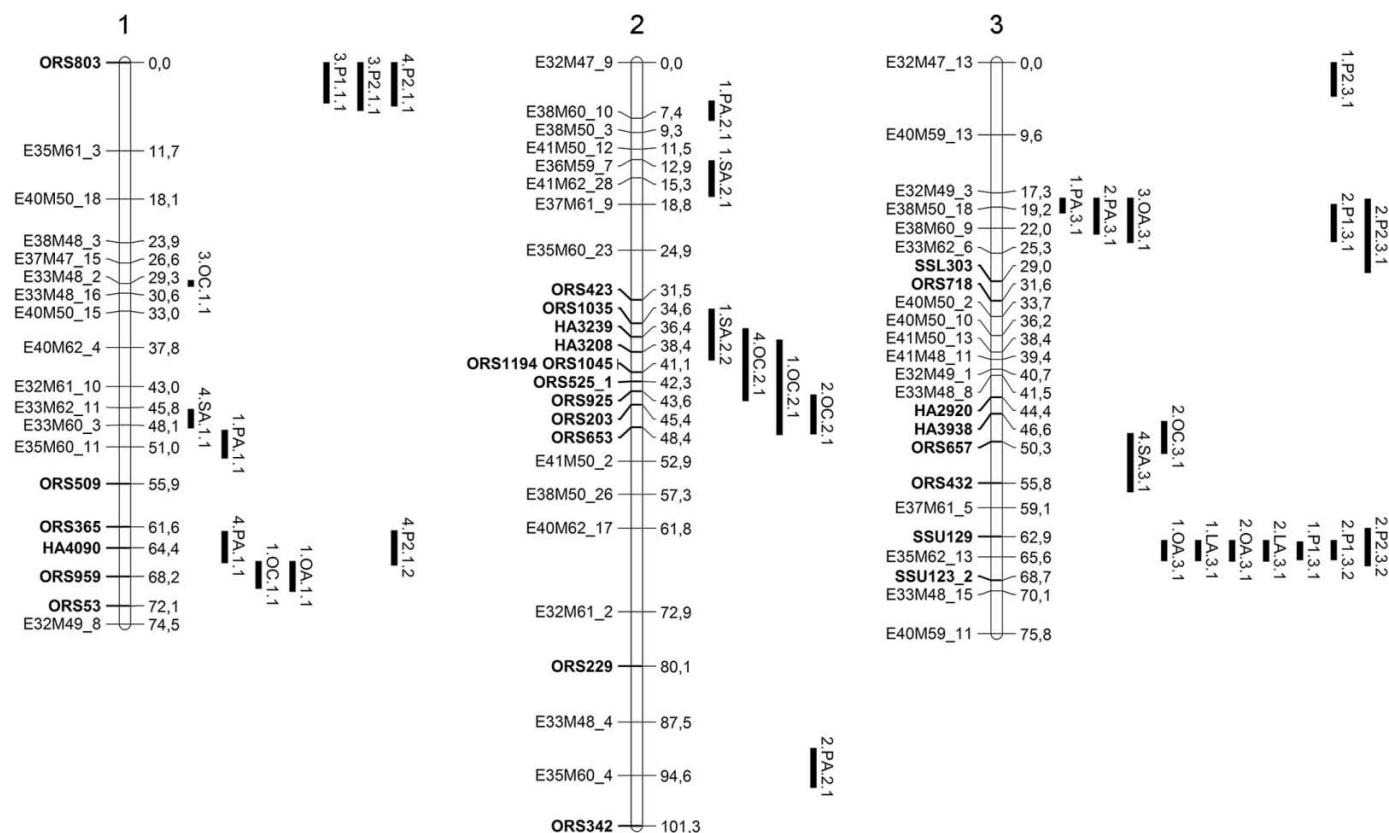
Note: QTLs are named as follows: a number indicating the conditions (1, well-watered greenhouse; 2, water-stressed greenhouse; 3, well-watered field; 4, water-stressed field), followed by an abbreviation for the principal component, the corresponding linkage group, and the number of QTLs in the linkage group. R^2 , proportion of individual phenotypic variance explained by the QTL.

of variation were used to map QTLs associated with independent systems of trait variation under each condition. The genetic gain (the difference between the best parents and the

mean of the top 10% of selected RILs) was obtained for each trait.

The sunflower reference map recently constructed by

Fig. 1. Improved molecular genetic linkage map of sunflower based on 304 AFLP and 191 SSR markers using 123 PAC2 × RHA266 recombinant inbred lines. The positions of the QTLs are shown on the right side of the linkage groups. Bars represent intervals associated with the QTLs. The numbers at the beginning of QTL names indicate the conditions: 1, well-watered greenhouse; 2, water-stressed greenhouse; 3, well-watered field; 4, water-stressed field. OC, oil content; PA, palmitic acid content; SA, stearic acid content; OA, oleic acid content; LA, linoleic acid content; P1, first principal component; P2, second principal component.



Poormohammad Kiani et al. (2007) was used for detection of QTLs. This map contains 304 AFLP and 191 SSR markers, with a mean density of one locus every 3.7 cM.

For mapping of QTLs and estimation of their effects, the method of composite interval mapping model 6 in WinQTL-Cart (version 2.5) was used (Wang et al. 2005). The control marker number and the window size were 15 and 15 cM, respectively. The experiment-wise threshold level to declare linkage was calculated from 1000 permutations of each genotype marker against the phenotype in the population. Linkage was reported as significant if the two statistics for a marker were greater than the critical value at $P = 0.05$ as described by Kassem et al. (2007).

Results

Phenotypic variation

Analyses of variance of the RILs and their parents (PAC2 and RHA266) in the greenhouse and field conditions showed highly significant variation between genotypes (RILs) (Table 1). The effect of water treatment was significant for SA and OA in greenhouse conditions, and PA was significantly affected in the field. The RIL × water treatment interaction was highly significant for all the traits in greenhouse conditions, whereas it was significant only for LA in the field experiment, indicating differences among RILs in response to drought.

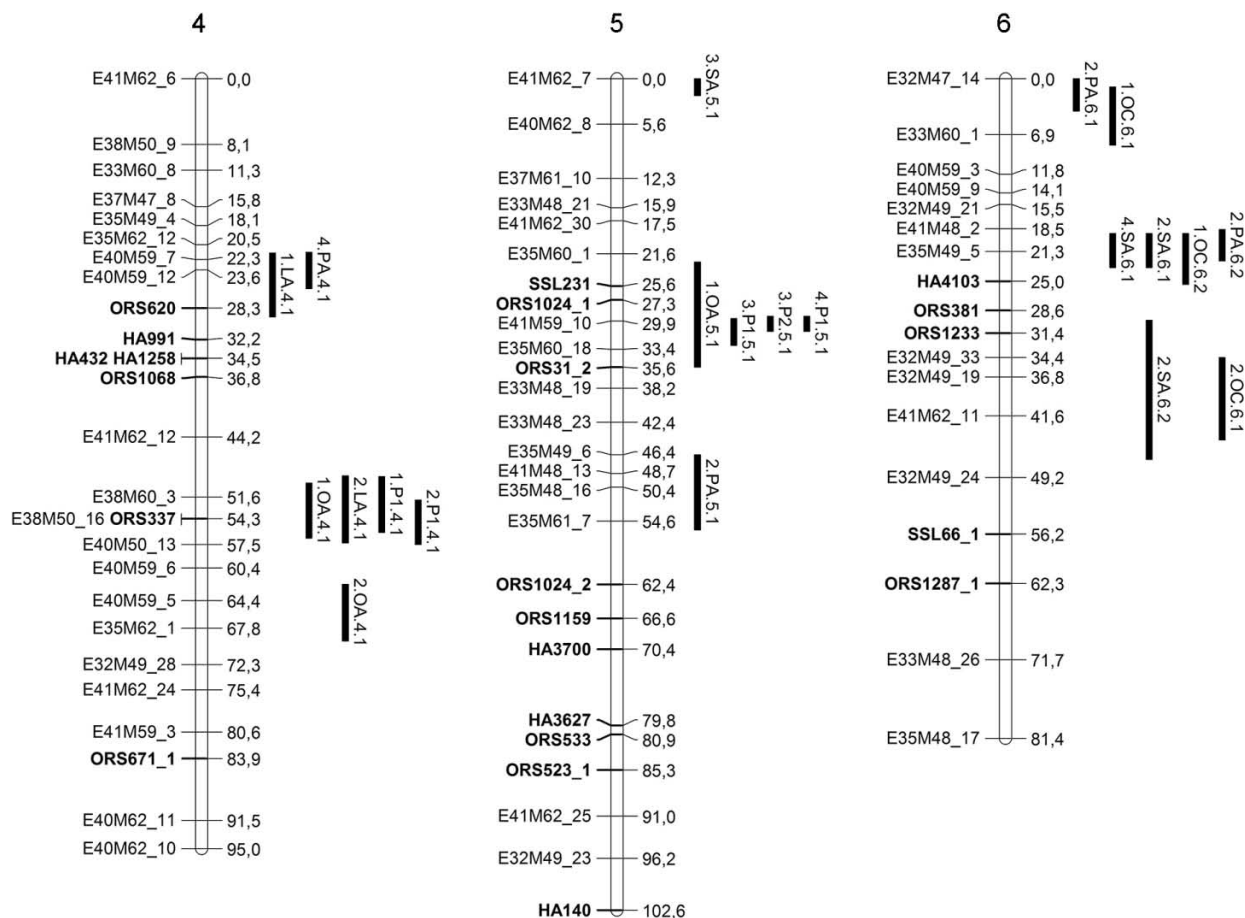
The phenotypic performance of RILs and their parents for all the traits in the greenhouse and field conditions is summarized in Table 2. The difference between parents was significant only for OA and LA under water-stressed conditions in the greenhouse. The difference between the mean of the RILs and the mean of the parents was significant only for PA under well-watered conditions in the field. Genetic gain, presented as the difference between the mean of the parents and the mean of 10% of selected RILs, was significant for all the traits in all conditions except for PA in the greenhouse under both water treatments and OC in the greenhouse under water stress.

Phenotypic correlations among different traits in all conditions are presented in Table 3. There was a significant positive correlation between LA and PA in all conditions. A significant negative correlation was observed between OC and SA, between OA and LA, and between PA and OA under all conditions.

QTL mapping

The map position and characteristics of the QTLs associated with the studied traits in the greenhouse and in the field are summarized in Tables 4, 5, and 6. QTLs were designated by 1, 2, 3, and 4 for the well-watered greenhouse, water-stressed greenhouse, well-watered field, and rainfed field conditions, respectively, followed by the abbreviation for

Fig. 1 (continued).



the trait, the corresponding linkage group, and the number of QTLs in the linkage group. For an easier overview of overlapping QTLs between traits and growth conditions, an image of all QTL regions is presented in Fig. 1.

One to 15 QTLs were found depending on trait and growth conditions. QTLs explained from 5% to 31% of the phenotypic variance of the traits (R^2). Both parental lines contributed to the expression of the different target traits and positive or negative additive effects are explained. Overlapping QTLs were detected for different traits on different linkage groups (Fig. 1).

The most important QTL for OC (*1.OC.16.1*) was found on linkage group 16 and explained 16% of the phenotypic variance. The positive alleles for this QTL come from RHA266. On linkage group 16 we also found 4 other QTLs for this trait under both water treatments. They were co-located with several QTLs controlling fatty acid traits (Tables 4 and 5 and Fig. 1). Several QTLs were detected for PA in all four conditions. The percentage of phenotypic variance explained by these QTLs ranged from 5% to 23%. The most important QTLs for PA (*4.PA.7.1* and *1.PA.1.1*) are located on linkage groups 7 and 1 (under water stress in the field and well-watered conditions in the greenhouse), with each one accounting for 23% of the phenotypic variance. Both parental genotypes control the effect of these two QTLs.

The percentage of phenotypic variance explained by QTLs of SA ranged from 5% to 22%. Most of the positive

alleles for these QTLs came from RHA266. The largest amount of phenotypic variance explained by a QTL of OA was 31% (*1.OA.3.1*). PAC2 alleles increased the level of OA for this QTL, whereas positive alleles for other QTLs of OA usually came from RHA266. The most important QTLs of LA explained 28% and 27% of the phenotypic variance (*1.LA.3.1* and *2.LA.3.1*). They overlapped on linkage group 3 in greenhouse conditions (Fig. 1). The positive alleles of these two QTLs came from RHA266.

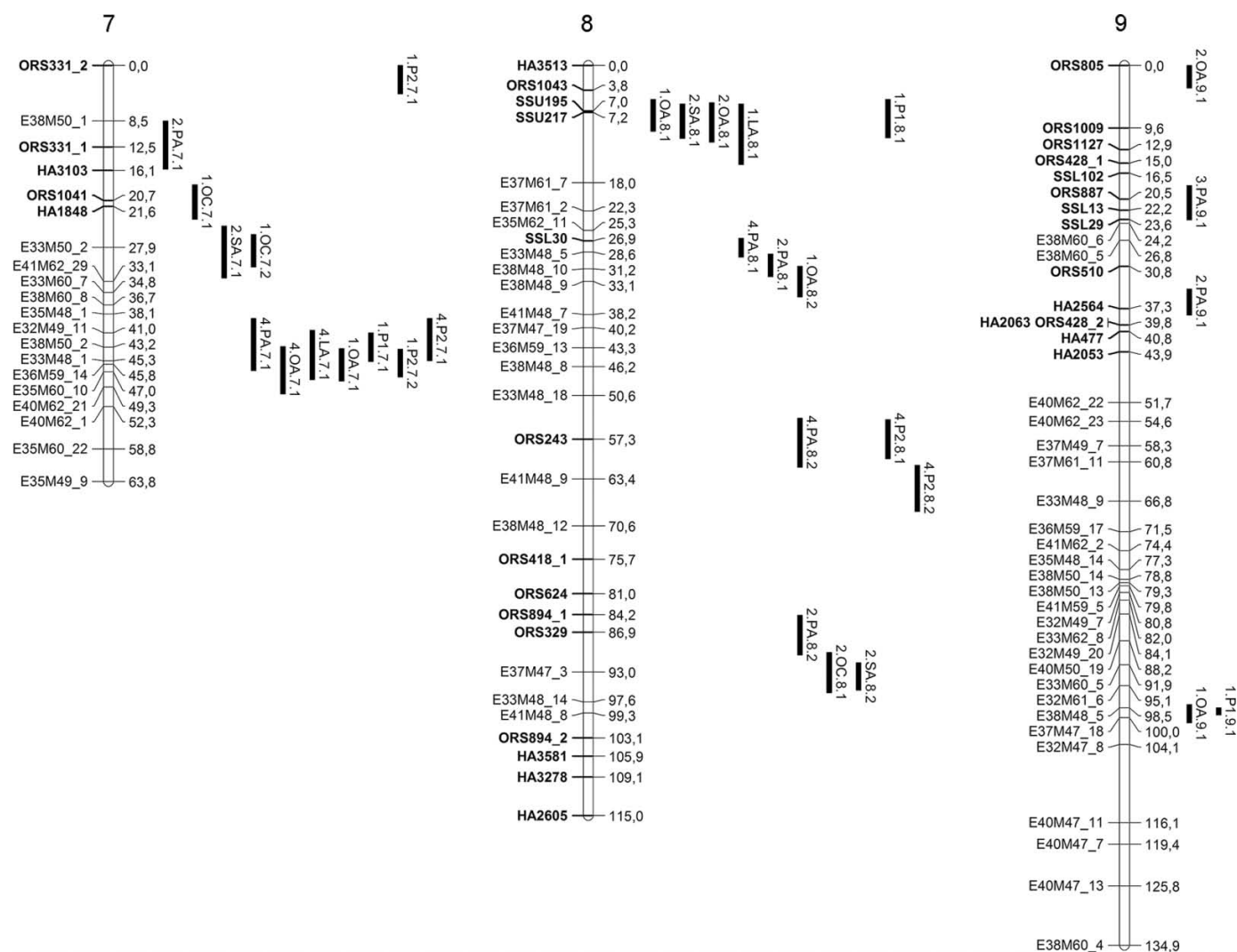
Several QTLs were also identified for the first and second principal components (P1 and P2) in each condition. The percentage of phenotypic variance explained by these QTLs ranged from 7% to 32%. The most important was a QTL of P2 (*4.P2.7.1*) under water-stressed conditions in the field, which was controlled by PAC2.

Discussion

Phenotypic variation among genotypes

The effects of water stress were significant for OA and SA in the greenhouse and for PA in the field, suggesting that water stress occurred earlier in the greenhouse than in the field. Water treatment responses were affected by a significant genotype \times water treatment interaction for most of the studied traits in the greenhouse and for LA in the field conditions, suggesting that response to water by a given genotype in relation to other genotypes varies between water treatments (Table 1).

Fig. 1 (continued).



Significant differences between the parents under water stress in the greenhouse for OA and LA indicated differential responses to water stress (Table 2). This suggested that the parental lines carry different genes for adaptation to water stress, which are inherited in some RILs via transgressive segregation. The difference between the mean of RILs and the mean of their parents was not significant for most of the traits (Table 2), indicating that the RILs used in this experiment are representative of the total possible recombinant lines from the cross PAC2 × RHA266.

A wide range of phenotypic variation was observed for all traits in the two water treatments in each experiment. Genetic gain, considered as the difference between the mean of 10% of selected RILs and the mean of the parents, was significant for most of the traits, showing transgressive segregation for the seed-quality traits (Table 2). Our results for OC confirm those of Mokrani et al. (2002). Transgressive segregation would be the result of accumulation of positive alleles coming from the parental lines. The positive and negative signs of additive effects at the different loci (Tables 4, 5, and 6) indicate the contribution of both parental lines and confirm the transgressive segregation observed at the phenotypic level. Highly significant correlations were observed

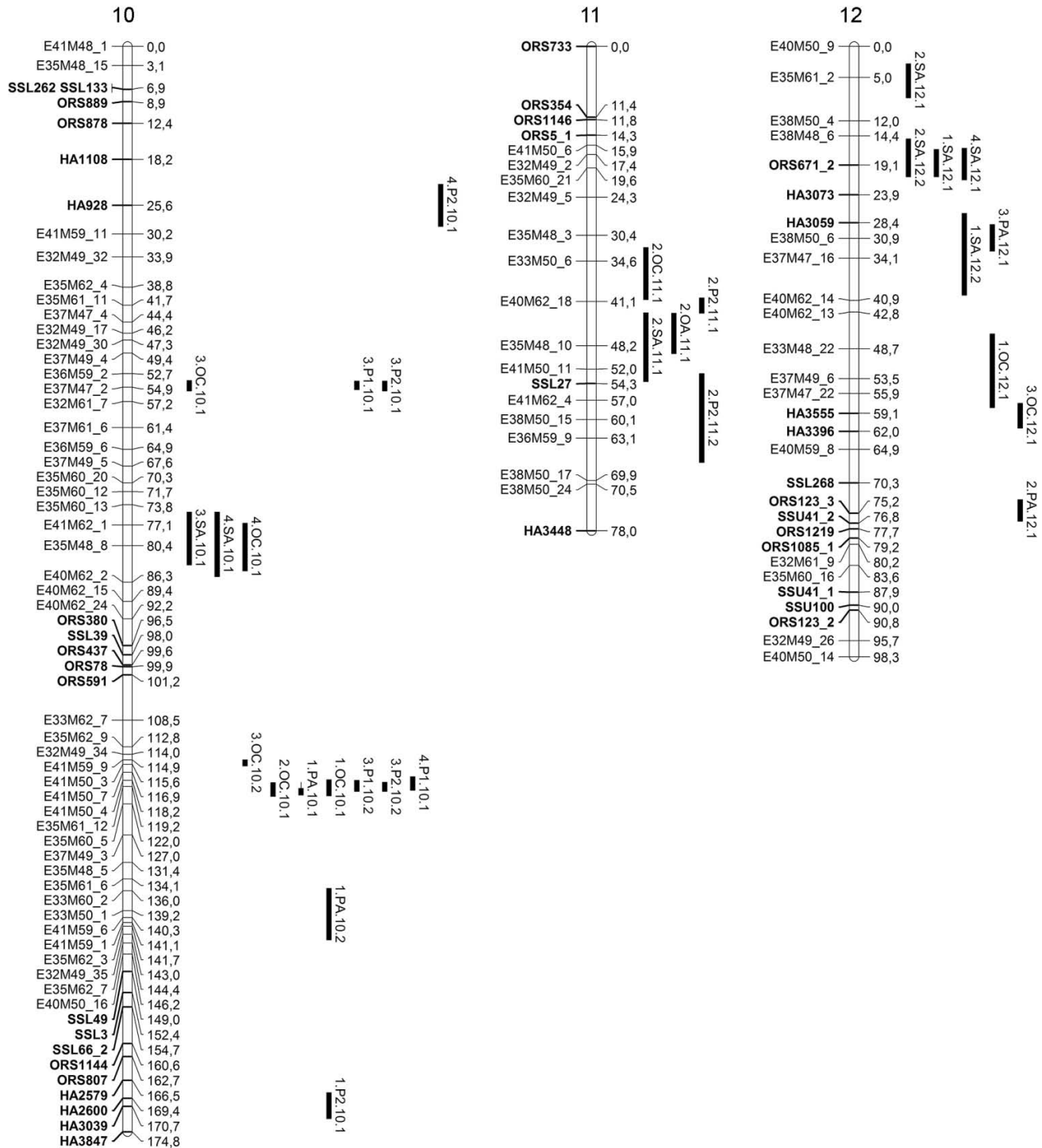
among the traits in all conditions (Table 3). Negative correlations between PA and OA were found in all conditions, which was similar to the results of Möllers and Schierholt (2002) for rapeseed. A significant negative correlation between OA and LA was also reported by Möllers and Schierholt (2002) in rapeseed and by Lagravère et al. (2004) in sunflower hybrids.

QTL analysis

QTLs identified in the present study showed that several putative genomic regions were involved in the expression of the studied traits under four experimental conditions (Tables 4, 5, and 6). The effects of QTLs ranged from 0.05 to 0.31. The transgressive phenotypes observed for some traits (Table 2) could be explained by the presence of QTLs of opposite sign in the two parents. The relatively low number of RILs used in our study may have had a negative influence on the accuracy of the calculated QTL effects and the ability to detect QTLs with small effects (Beavis 1994). This was, to some degree, compensated by the higher precision of the phenotyping and the use of our new improved saturated map with 495 markers.

The present study also enabled us to investigate the ge-

Fig. 1 (continued).

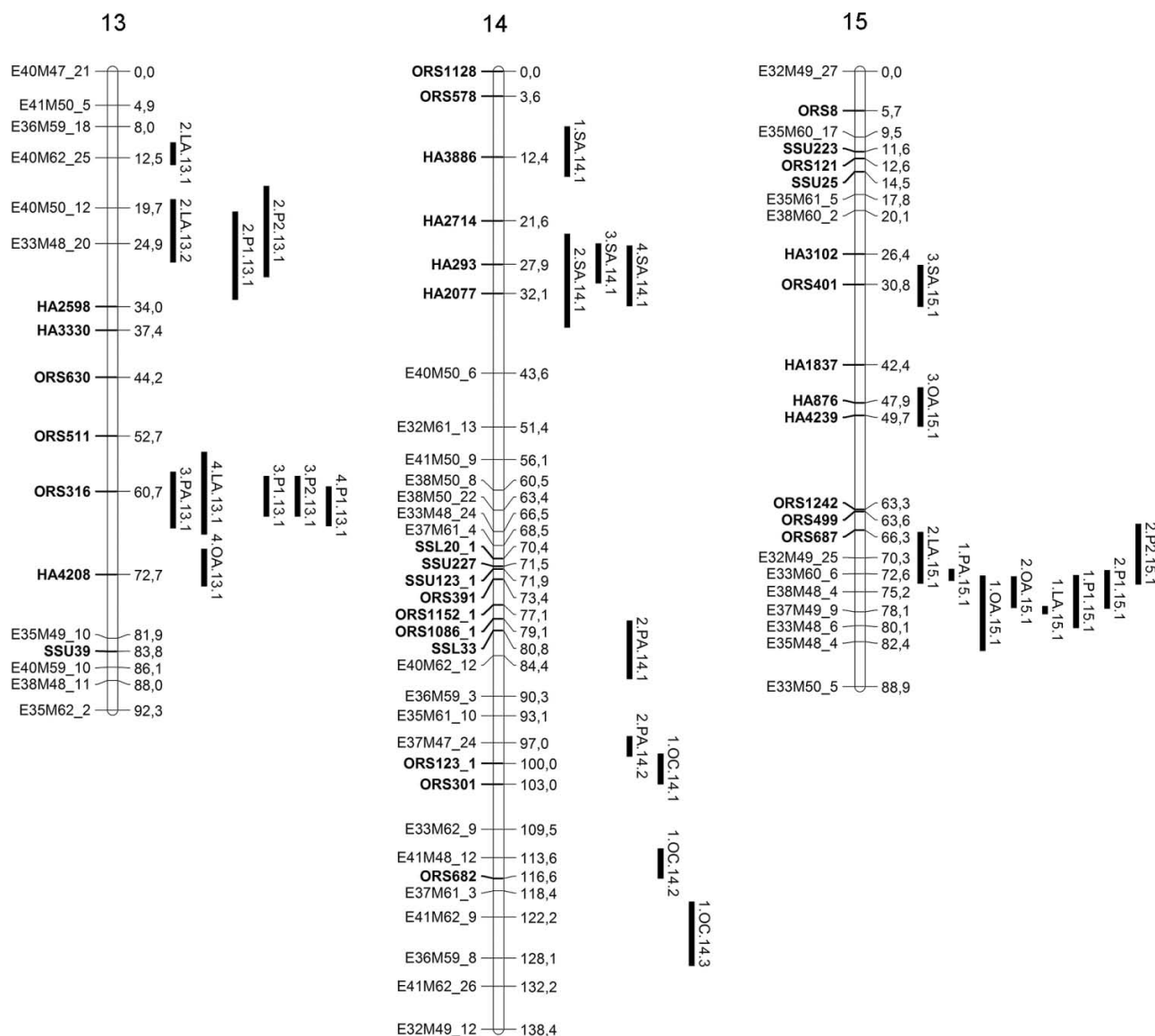


netic basis of trait association by looking for co-location of corresponding QTLs on the genetic map under different growth conditions. Identification of QTLs influencing several traits could increase the efficiency of marker-assisted selection and enhance genetic progress (Upadhyayula et al. 2006).

QTLs for OC overlapped with each other in 4 chromosomal regions (linkage groups 2, 10, 12, and 16) and in all conditions (Fig. 1). The most important region for OC was located on linkage group 16, where 3 QTLs were detected

under water-stressed conditions in the greenhouse or field and 2 QTLs were detected under well-watered conditions in the greenhouse or field. Three of these QTLs (*4.OC.16.1*, *2.OC.16.1*, *3.OC.16.1*) are associated to an SSR marker (*ORS418_2*). Moreover, these three QTLs overlapped with a QTL of OA (*3.OA.16.1*) detected in well-watered field conditions and one of these QTLs (*3.OC.16.1*) overlapped a QTL of LA (*2.LA.16.1*) detected in water-stressed greenhouse conditions. These overlapping QTLs indicate the existence of a common genetic base that controls OC and its

Fig. 1 (continued).



principal components, OA and LA. We also detected another co-located region for OC and OA in linkage group 1 that is linked to marker *ORS959* in well-watered greenhouse conditions. This QTL (associated with marker *ORS959*) was also reported by Tang et al. (2006) for oil content in sunflower recombinant inbred lines. We identified the QTL (2.OA.16.2) linked to *ORS407* under water-stressed conditions, which was also reported by Tang et al. (2006) for oil content in irrigated conditions. So this region is important for oil content under water-stressed and well-watered conditions.

Several QTLs were found for OC, in all four conditions, that overlapped with QTLs of palmitic and stearic acids on linkage groups 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, and 14. In water-stressed conditions in both the greenhouse and the field, the QTLs of OC were co-located with QTLs of SA on linkage groups 3, 6, 8, and 10. This may explain the significant negative correlation between OC and SA. An overlapping region on linkage group 3 (2.OA.3.1 and 4.SA.3.1) was linked to an SSR marker (*ORS657*). These QTLs, controlled by the

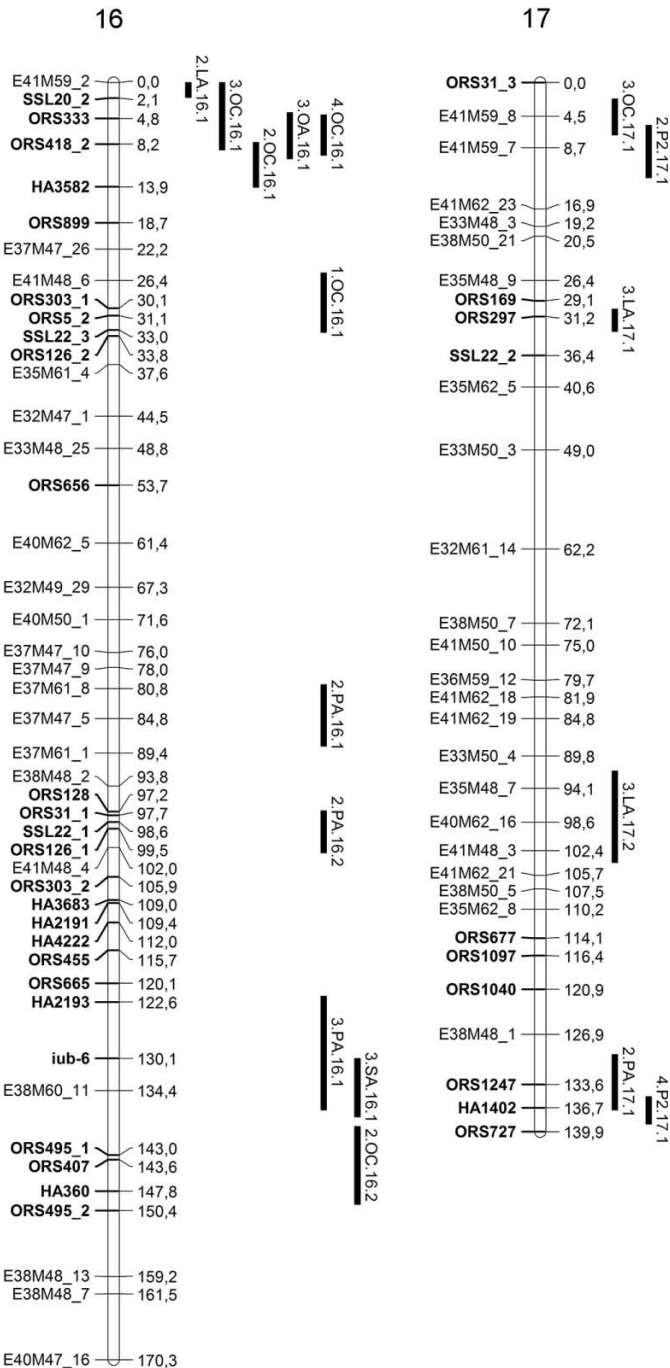
RHA266 alleles, appear to be important in water-stressed conditions in the greenhouse and the field.

Overlapping QTLs for PA and SA were detected on linkage groups 6, 12, and 16. Similar overlapping QTLs of PA and SA were reported by Burke et al. (2005) and Pérez-Vich et al. (2002b) in sunflower. It is possible that overlapping regions found in our study are loci with pleiotropic effects on both enzyme activities.

Several specific regions for PA on linkage groups 1, 2, 5, 7, 9, 10, 14, and 16 were identified. Except for some on linkage groups 1, 2, 9, and 10, all were identified under water-stressed conditions. An important overlapping region for PA (2.PA.8.1 and 4.PA.8.1) was observed on linkage group 8 under both water-stressed conditions (i.e., greenhouse and field), and these QTLs explained 15% and 13% of phenotypic variance. The favorable alleles for these QTLs come from PAC2.

On linkage groups 12 and 14, two regions were detected where 3 QTLs for SA were co-located. In both the greenhouse and the field, these regions are specific for controlling

Fig. 1 (concluded).



SA variation in well-watered and water-stressed conditions. The co-located QTLs on linkage group 12, detected under both water treatments in the greenhouse and under water stress in the field, were linked to SSR marker *ORS671_2*. There is an important overlap among QTLs of SA, OA, and LA on linkage group 8. These QTLs are associated with SSR marker *SSU217*. This overlap should be a pleiotropic region that controls two pathways, FatA (stearoyl-ACP desaturase) and FatB (acyl-ACP thioesterase), in sunflower seed (Pleite et al. 2006). The SA content in oil seeds is mainly controlled by the action of these two intraplasmic enzymes (Cantisán et al. 2000).

Table 7. Number of QTLs detected for each trait in each water treatment (WW, well-watered; WS, water-stressed) as well as number of QTLs in common between water treatments and phenotypic correlation coefficients between water treatments.

Trait	No. of QTLs detected		No. of common QTLs	Phenotypic correlation coefficient
	WW	WS		
OC	18	11	3	0.57***
PA	10	20	1	0.37***
SA	10	15	3	0.52***
OA	12	8	4	0.67***
LA	6	8	1	0.65***

Note: OC, oil content; PA, palmitic acid content; SA, stearic acid content; OA, oleic acid content; LA, linoleic acid content. ***, significant at a probability level of 0.001.

For this reason favorable alleles for SA and OA come from RHA266, but increasing LA is controlled by PAC2 alleles. The *Es3* gene has been mapped on linkage group 8 in sunflower, which is linked with SSR markers *ORS243* and *ORS1161* (Pérez-Vich et al. 2006). In our study, one of these SSR markers (*ORS243*) is linked with a QTL of PA (4.PA.8.2) detected under water stress in the field (Table 5). *Es3* determines a very high stearic acid phenotype in sunflower. Also, *Es3* pleiotropically affects the levels of other seed-oil fatty acids (Pérez-Vich et al. 2006). This effect was not unexpected because seed-oil fatty acids are formed by means of enzymatically controlled carbon chain elongations and desaturations (Somerville et al. 2000). Therefore, a change in one fatty acid will generally affect the levels of the others, resulting in significant correlations among traits as we have demonstrated in our experiments (Table 3). Moreover, Pérez-Vich et al. (2002b) identified a minor QTL that affected both SA and OA. Note that we have detected a QTL for SA (2.SA.11.1) on linkage group 11 that is co-located to a QTL of OA (2.OA.11.1) in water-stressed conditions in the greenhouse. We suggest that this region should control stearoyl-ACP desaturase, converting SA to OA (Cantisán et al. 2000) under water-stressed conditions.

Overlapping occurred for QTLs of OA and LA on 5 linkage groups (3, 4, 7, 8, and 15). This can be explained by correlation between OA and LA as well as by a specific gene for Δ^{12} -desaturase, which converts oleic acid into linoleic acid in grains and modifies fatty acid composition, reported in sunflower and soybeans (Garcés et al. 1989; Heppard et al. 1996). One of these overlapping QTLs, on linkage group 4, is associated with marker *ORS337*, which was also presented by Tang et al. (2006) for oil content. The Δ^{12} -desaturase activity decreases OA and increases LA simultaneously. However, molecular study confirmed that the Δ^{12} -desaturase transcript was not expressed at the same time for different genotypes. The lack of Δ^{12} -desaturase transcript accumulation could be due to non-expression of this gene or to faster degradation of the mRNA (Lagravère et al. 2004). The Δ^{12} -desaturase activity is also influenced by environmental conditions (Garcés and Mancha 1991; Baldini et al. 2002). In the present study we detected specific regions responsible for OA and LA variations, under

Table 8. Percentage of individual phenotypic variance explained by the main non-specific QTLs on all the linkage groups (LGs) under well-watered greenhouse, water-stressed greenhouse, well-watered field, and water-stressed field conditions.

Trait	LG	Marker	Greenhouse		Field	
			Well-watered	Water-stressed	Well-watered	Water-stressed
OC	16	ORS418_2	—	0.10	0.07	0.08
PA	3	E38M50_18	0.11	0.05	—	—
SA	14	HA293	—	0.13	0.12	0.13
	6	E35M49_5	—	0.05	—	0.07
	12	ORS671_2	0.14	0.07	—	0.07
OA	3	E35M62_13	0.31	0.22	—	—
	8	SSU217	0.06	0.10	—	—
	15	E38M48_4	0.08	0.09	—	—
LA	3	E35M62_13	0.28	0.27	—	—
	8	SSU217	0.16	0.10	—	—
P1	3	E35M62_13	0.23	0.07	—	—
	4	ORS337	0.15	0.2	—	—
	5	E41M59_10	—	—	0.15	0.14
P2	13	ORS316	—	—	0.11	0.21
	1	ORS803	—	—	0.08	0.08

Note: OC, oil content; PA, palmitic acid content; SA, stearic acid content; OA, oleic acid content; LA, linoleic acid content; P1, first principal component; P2, second principal component.

water-stressed conditions. Burke et al. (2005) also detected two overlapping OA and LA QTLs in sunflower.

Beside common QTLs, 4 specific QTLs for OA (linkage groups 4, 9, 13, and 15) and 3 for LA (linkage groups 17 and 13) were also detected under different conditions. These regions independently affect the levels of OA and LA. The favorable alleles for some QTLs of OA and one QTL of LA (*3.LA.17.1*) come from RHA266. This parent is interesting because it allows the quantities of OA and LA to be increased independently.

In our study most of the QTLs for principal components (P1 and P2) were co-located with the fatty acid QTLs. But we also detected some principal-component QTLs that did not correspond to the fatty acid QTLs, such as important overlapping QTLs of P1 (*3.P1.1.1*) and P2 (*3.P2.1.1* and *4.P2.1.1*) in the field under well-watered and water-stressed conditions on linkage group 1. Also, on linkage group 10, two regions of principal-component QTLs (*4.P2.10.1*, *1.P2.10.1*) were observed which did not correspond to the fatty acid and OC QTLs. Overlapping QTLs for P1 (*3.P1.10.1*) and P2 (*3.P2.10.1*) were co-located to a QTL for OC (*3.OC.10.1*), so this region is important for oil content under well-watered conditions. Two other principal-component QTLs found on linkage groups 3 (*1.P2.3.1*) and 7 (*1.P2.7.1*) explained a high proportion of the phenotypic variance (21% and 13%). These are important regions that do not correspond to fatty acid QTLs.

Generally, QTL studies in sunflower have been performed under only one water regime. Such studies do not lead to separation of constitutive QTLs from adaptive ones. Sorting out constitutive from adaptive QTL effects is possible by evaluation of the same mapping population under different conditions. The present study enabled us to investigate the genetic basis of trait association by looking for co-location of corresponding QTLs for grain quality on the genetic map under two water regimes. Apart from an understanding of the genetic complexity of traits, the major output of the

QTL analysis was the identification of relevant genomic regions that should be included in breeding programs for grain quality under drought.

We have detected 56 QTLs for seed-quality traits under well-watered conditions and 62 QTLs under water-stressed conditions. Twelve of these QTLs were common between well-watered and water-stressed conditions (Table 7). Twenty principal-component QTLs under well-watered conditions and 22 under water-stressed conditions were also identified, 8 of which were common between well-watered and water-stressed conditions. The correlation between water treatments was highly significant for all traits (Table 7), which may explain the co-locations of the corresponding QTLs. On the other hand, these common QTLs (between well-watered and water-stressed conditions) were stable across water treatments and the expression of traits was not affected by water treatment. Three QTLs that do not present an interaction with environment for our studied traits (non-specific QTLs) were associated to SSR markers *ORS418_2*, *HA293*, and *ORS671_2* (Table 8). Several QTLs were common between two conditions, for example the QTL associated to *SSU217* on linkage group 8 for OA and LA. Some of the specific QTLs involved in quality traits in this study may correspond to gene candidates acting directly or in a regulatory function under water stress. As an example, we identified the region containing marker *ORS243* on linkage group 8, which is linked to the *Es3* gene with pleiotropic effects in fatty acid composition.

Acknowledgments

This research was supported by Gundishapur project No. 12267RD. The authors thank the French and Iranian ministries of research for providing funds and the necessary facilities.

References

Al-Chaarani, G.R., Gentzbittel, L., Huang, X.Q., and Sarrafi, A.

2004. Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **109**: 1353–1360. doi:10.1007/s00122-004-1770-1. PMID:15365625.
- Ascherio, A., and Willett, W.C. 1997. Health effects of *trans* fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**: 1006S–1010S.
- Ayerdi Gotor, A., Farkas, E., Berger, M., Labalette, F., Centis, S., Daydé, J., and Calmon, A. 2007. Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**: 525–530. doi:10.1002/ejlt.200600236.
- Baldini, M., Giovanardi, R., Tahmasebi-Enferadi, S., and Vannozzi, G.P. 2002. Effects of water regime on fatty acid accumulation and final fatty acid composition in the oil of standard and high oleic sunflower hybrids. *Ital. J. Agron.* **16**: 119–126.
- Beavis, W.D. 1994. The power and deceit of QTL experiments: lessons from comparative studies. In *Proceedings of the 49th Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference*, Chicago, 7–8 December 1994. Edited by D. Wilkinson. American Seed Trade Association, Washington. pp. 250–266.
- Burke, J.M., Knapp, S.J., and Rieseberg, L.H. 2005. Genetic consequences of selection during the evolution of cultivated sunflower. *Genetics*, **171**: 1933–1940. doi:10.1534/genetics.104.039057. PMID:15965259.
- Cantisán, S., Martínez-Force, E., and Garcés, R. 2000. Enzymatic studies of high stearic acid sunflower seed mutants. *Plant Physiol. Biochem.* **38**: 377–382. doi:10.1016/S0981-9428(00)00758-0.
- Dwivedi, S.L., Nigam, S.N., Rao, R.C.N., Singh, U., and Rao, K.V.S. 1996. Effect of drought on oil, fatty acids and protein contents of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *Field Crops Res.* **48**: 125–133. doi:10.1016/S0378-4290(96)01027-1.
- Fernández-Martínez, J., Jimenez, A., Dominguez, J., Garcia, J.M., Garcés, R., and Mancha, M. 1989. Genetic analysis of the high oleic acid content in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, **41**: 39–51. doi:10.1007/BF00022409.
- Fick, G.N. 1975. Heritability of oil content in sunflower. *Crop Sci.* **15**: 77–78.
- Fick, G.N. 1984. Inheritance of high oleic acid in the seed oil of sunflower. In *Proceedings of Sunflower Research Workshop*, Bismarck, N. Dak., 1 February 1984. National Sunflower Association, Bismarck, N. Dak. p. 9.
- Flagella, Z., Rotunno, T., Tarantino, E., Di Caterina, R., and De Caro, A. 2002. Changes in seed yield and oil fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and the water regime. *Eur. J. Agron.* **17**: 221–230. doi:10.1016/S1161-0301(02)00012-6.
- Garcés, R., and Mancha, M. 1991. *In vitro* oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Phytochemistry*, **30**: 2127–2130. doi:10.1016/0031-9422(91)83599-G.
- Garcés, R., García, J.M., and Mancha, M. 1989. Lipid characterization in seeds of a high oleic acid sunflower mutant. *Phytochemistry*, **28**: 2597–2600. doi:10.1016/S0031-9422(00)98047-6.
- Harwood, J.L. 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1301**: 7–56. PMID:8652653.
- Heppard, E.P., Kinney, A.J., Stecca, K.L., and Miao, G.H. 1996. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiol.* **110**: 311–319. doi:10.1104/pp.110.1.311. PMID:8587990.
- Hongtrakul, V., Slabaugh, M.B., and Knapp, S.J. 1998. A seed specific Δ -12 oleate desaturase gene is duplicated, rearranged, and weakly expressed in high oleic acid sunflower lines. *Crop Sci.* **38**: 1245–1249.
- Kassem, A.M., Meksem, K., Wood, A.J., and Lightfoot, D.A. 2007. A microsatellite map developed from late maturity germplasm ‘Essex’ by ‘Forrest’ detects four QTL for soybean seed yield expected from early maturing germplasm. *Rev. Biol. Biotech.* **6**: 11–19.
- Kris-Etherton, P.M., and Yu, S. 1997. Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**: 1628S–1644S. PMID:9129503.
- Lacombe, S., and Berville, A. 2001. A dominant mutation for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed oil is genetically linked to a single oleate-desaturase RFLP locus. *Mol. Breed.* **8**: 129–137. doi:10.1023/A:1013358711651.
- Lagravère, T., Kleiber, D., Surel, O., Calmon, A., Berville, A., and Daydé, J. 2004. Comparison of fatty acid metabolism of two oleic and one conventional sunflower hybrids: a new hypothesis. *J. Agron. Crop Sci.* **190**: 223–229. doi:10.1111/j.1439-037X.2004.00099.x.
- Leon, A.J., Lee, M., and Andrade, F.H. 2001. Quantitative trait loci for growing degree days to flowering and photoperiod response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **102**: 497–503. doi:10.1007/s001220051673.
- Leon, A.J., Andrade, F.H., and Lee, M. 2003. Genetic analysis of seed-oil concentration across generations and environments in sunflower. *Crop Sci.* **43**: 135–140.
- Martínez-Rivas, J.M., Sperling, P., Lühs, W., and Heinz, E. 2001. Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (*FAD2*) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Mol. Breed.* **8**: 159–168. doi:10.1023/A:1013324329322.
- Miller, J.F., Zimmerman, D.C., and Vick, B.A. 1987. Genetic control of high oleic acid content in sunflower oil. *Crop Sci.* **27**: 923–926.
- Mokrani, L., Gentzbittel, L., Azanza, F., Fitamant, L., Al-Chaarani, G., and Sarrafi, A. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **106**: 149–156. doi:10.1007/s00122-002-1011-4. PMID:12582883.
- Möllers, C., and Schierholt, A. 2002. Genetic variation of palmitate and oil content in a winter oilseed rape doubled haploid population segregating for oleate content. *Crop Sci.* **42**: 379–384.
- Muriel, J.L., and Downes, R.W. 1974. Effects of periods of moisture stress during various phases of growth of sunflower in the greenhouse. In *Proceedings of the 6th International Sunflower Conference*, Bucharest, Romania, 22–24 July 1974. Edited by A.V. Vranceanu. ISA Bucharest, Romania. pp. 127–131.
- Murphy, D.J. 1994. *Designer oil crops: breeding, processing and biotechnology*. VCH Weinheim, New York.
- Nel, A.A., Loubser, H.L., and Hammes, P.S. 2002. Development and validation of relationships between sunflower seed quality and easily measurable seed characteristics for grading purposes. *S. Afr. J. Plant Soil*, **19**: 201–205.
- Pérez-Vich, B., Garcés, R., and Fernández-Martínez, J.M. 2000. Genetic relationships between loci controlling the high stearic and the high oleic acid traits in sunflower. *Crop Sci.* **40**: 990–995.
- Pérez-Vich, B., Garcés, R., and Fernández-Martínez, J.M. 2002a. Inheritance of high palmitic acid content in the sunflower mutant CAS-12 and its relationship with high oleic content. *Plant Breed.* **121**: 49–56. doi:10.1046/j.1439-0523.2002.00655.x.
- Pérez-Vich, B., Fernández-Martínez, J.M., Grondona, M., Knapp, S.J., and Berry, S.T. 2002b. Stearoyl-ACP and oleoyl-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying high stearic and high oleic acid mutant phenotypes in sunflower.

- Theor. Appl. Genet. **104**: 338–349. doi:10.1007/s001220100712. PMID:12582706.
- Pérez-Vich, B., Muñoz-Ruz, J., and Fernández-Martínez, J.M. 2004a. Developing midstearic acid sunflower lines from a high stearic acid mutant. *Crop Sci.* **44**: 70–75.
- Pérez-Vich, B., Knapp, S.J., Leon, A.J., Fernández-Martínez, J.M., and Berry, S.T. 2004b. Mapping minor QTL for increased stearic acid content in sunflower seed oil. *Mol. Breed.* **13**: 313–322. doi:10.1023/B:MOLB.0000034081.40930.60.
- Pérez-Vich, B., Leon, A.J., Grondona, M., Velasco, L., and Fernández-Martínez, J.M. 2006. Molecular analysis of the high stearic acid content in sunflower mutant CAS-14. *Theor. Appl. Genet.* **112**: 867–875. doi:10.1007/s00122-005-0188-8. PMID:16362273.
- Pleite, R., Martínez-Force, E., and Garcés, R. 2006. Increase of the stearic acid content in high-oleic sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 9383–9388. doi:10.1021/jf061654f. PMID:17147422.
- Poormohammad Kiani, S., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A., et al. 2007. Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci.* **172**: 773–787. doi:10.1016/j.plantsci.2006.12.007.
- Roche, J., Bouniols, A., Mouloungui, Z., Barranco, T., and Cerny, M. 2006. Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108**: 287–297. doi:10.1002/ejlt.200500310.
- SAS Institute Inc. 1996. SAS/STAT user's guide, version 6, 4th ed., Vols. 1 and 2. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Schneiter, A.A., and Miller, J.F. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* **21**: 901–903.
- Schuppert, G.F., Tang, S., Slabaugh, M.B., and Knapp, S.J. 2006. The sunflower high-oleic mutant *Ol* carries variable tandem repeats of *FAD2-1*, a seed-specific oleoyl-phosphatidyl choline desaturase. *Mol. Breed.* **17**: 241–256. doi:10.1007/s11032-005-5680-y.
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J.G., and Ohlrogge, J.B. 2000. Lipids. In *Biochemistry and molecular biology of plants. Edited by B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R.L. Jones.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md. pp. 456–527.
- Tang, S., Leon, A., Bridges, W.C., and Knapp, S.J. 2006. Quantitative trait loci for genetically correlated seed traits are tightly linked to branching and pericarp pigment loci in sunflower. *Crop Sci.* **46**: 721–734. doi:10.2135/cropsci2005.0006-7.
- Upadyayula, N., da Silva, H.S., Bohn, M.O., and Rocheford, T.R. 2006. Genetic and QTL analysis of maize tassel and ear inflorescence architecture. *Theor. Appl. Genet.* **112**: 592–606. doi:10.1007/s00122-005-0133-x. PMID:16395569.
- Urie, A.L. 1984. Inheritance of very high oleic acid content in sunflower. In *Proceedings of Sunflower Research Workshop, Bismarck, N. Dak., 1 February 1984.* National Sunflower Association, Bismarck, N. Dak. pp. 8–9.
- Wang, S., Basten, C.J., and Zeng, Z.B. 2005. Windows QTL Cartographer V2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, N.C.. Available from <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>.

Genetic control of protein content and seed characteristics under water-stress condition in sunflower

A. Ebrahimi^{1,2}, P. Maury², M. Berger³, A. Calmon³, P. Grieu^{2*}, A. Sarrafi^{1*}

¹INP-ENSAT, IFR 40, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), F-31326 Castanet Tolosan, France

²INP-ENSAT, INRA, UMR 1248 Agrosystèmes & Développement Territorial, F-31326 Castanet Tolosan, France

³ UMR INRA/ESAP 1054 - Laboratoire d'agrophysiologie, Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan, 31076 Toulouse Cedex 03, France

* Ph.D-supervisors

Corresponding author: Professor Ahmad Sarrafi
Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), IFR 40, INP-ENSAT, 18
Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France
e-mail : sarrafi@ensat.fr
Tel: + 33 5 62193580
Fax: + 33 5 62193580

Abstract

The aim of this study was to identify genomic regions controlling seed protein content, ~~grain~~, kernel and hull weights as well as seed density in water-stress condition in sunflower. The experiments consisted of a split-plot design (water treatment and RILs) with three blocks in two environments (greenhouse and field). High significant variation was showed between genotypes for all the traits as well as for water treatment-genotype interaction. Several specific and non-specific QTLs were detected for all the traits under well-watered and water-stressed conditions. Two SSR markers *ORS671_2* and *HA2714* linked to protein content were identified which have not interaction with water treatments in greenhouse conditions. We also detected *E35M60_4* marker associated with kernel weight which had not interaction with water treatment. A specific QTL for protein content was detected with important phenotypic variance (17%) under water-stressed conditions. Overlapping QTL for protein content and seed density were identified in linkage group 15. This region probably has peliotropic effect on protein content and seed density. QTLs for protein content co-located with grain weight traits were also identified.

Key words: QTL, SSR marker, protein content, seed density, sunflower.

Introduction

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is an important oil seed crop which can be also a valuable source of protein. Sunflower meal is a potential source of protein for human consumption due to its high nutritional value and lack of antinutritional factors (Sosulski 1979). The structure and functionality of two major proteins fractions in sunflower seed are described in detail by González-Pérez and Vereijken (2007). However, only very little is known about the effect of water stress on agronomically important seed quality traits in this species. Genetic variability was observed among 118 F3 families for grain weight per plant, 1000-grain weight, percentage of oil in grain and sowing to flowering date under well-watered condition (Mokrani et al. 2002). Al-Chaarani et al. (2004) also reported genetic variability between 77 recombinant inbred lines for grain weight per plant, 1,000-grain weight, percentage of oil in grains, sowing-to-flowering date, plant height, stem diameter and head diameter. Mokrani et al. (2002) reported high heritability (55%) for 1000 grain weight in sunflower. High heritability estimates were also observed for hull percentage and 1000-seed weight in sunflower inbred lines by Sujatha et al. (2002). High heritability was reported for seed density, in sunflower inbred line as well as in two populations of soybean (0.83 to 0.88) under irrigated condition (Fehr and Weber, 1968 and Sujatha et al. 2002). High heritability values were also observed for protein content (70% and 60%) in rapeseed (Felde et al. 2006 and Gül 2002). Heritability of seed density is generally higher than that of seed yield and selection on seed density could increase protein content without decreasing seed yield in soybean (Li and Burton 2002).

Drought is the most serious factor for decreasing crop growth and productivity. Water-stress during grain filling has an effect on the volume of grain (Baldini et al. 1999), grain weight (Unger, 1982) and hull percentage (Connor and Hall, 1997) in sunflower. As far as we know the effect of water-stress on seed protein content in sunflower has not been reported in the literature. Protein deposition in wheat grain is shortened by drought stress (Triboï et al. 2003). In such case, significant modifications of protein composition at maturity results from changes in protein deposition during grain-filling (Triboï et al. 2003). Continuous or late water stress significantly increases protein contents at maturity in wheat (Ozturk and Aydin 2004). Drought stress also significantly increases total protein content in peanuts (Dwivedi et al. 1996). In soybean, increasing water stress tends to decrease protein and increase oil (Specht et al. 2001).

The basis of QTL detection is to associate variation of the measured phenotype with genetic markers in natural or controlled segregating populations. Because of their direct interest for plant breeding, QTL for agronomic traits are the most frequently studied. Linkage maps have been described by Tang et al. (2002) and Yu et al. (2003) with 203 simple sequence repeat (SSR) and

insertion-deletion (INDEL) markers in sunflower. Recently Poormohammad Kiani et al. (2007) constructed a genetic map with 304 AFLP and 191 SSRs in this species and identified QTLs for a range of physiological traits. Mokrani et al. (2002) detected one QTL for 1000 grain weight in sunflower. Moreover Al-Chaarani et al. (2004) reported three QTLs for this trait and one of them was a major QTL with 37% phenotypic variance. QTLs controlling important traits such as in vitro regeneration parameters (Flores Berrios et al. 2000a–c), grain weight per plant, 1000-grain weight, percentage of oil in grain and sowing to flowering date (Mestries et al. 1998; Mokrani et al. 2002; Leon et al. 2003), resistance to downy mildew and black stem (Al-Chaarani et al. 2002), tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* (Mestries et al. 1998; Bert et al. 2002), as well as seed traits (Tang et al. 2006) are also detected in sunflower.

Identification of QTLs controlling important traits for screening genotypes adapted to drought stress is a major challenge to plant breeder. Improved drought tolerance involves the transfer of the traits responsible for drought tolerance to high-yielding and agronomically acceptable cultivars. However, the studies mentioned above have been conducted under well-watered conditions. Poormohammad Kiani et al. (2007) reported several specific QTLs under drought condition for plant water status traits (leaf water potential, relative water content, turgor potential, osmotic potential). Several specific QTLs under drought condition for oil content and fatty acid composition were also identified in sunflower (Ebrahimi et al. 2008)

As far as we know genetic control of seed protein content and seed weight traits in sunflower under water-stressed conditions are not reported in the literature. The aim of this study was to identify QTLs controlling seed protein content and seed weight (hull and kernel weight, seed density) in sunflower in well-watered and water-stressed conditions. Comparisons were also made between QTLs controlling these traits in these two conditions.

Materials and methods

Plant material and experimental conditions

The recombinant inbred lines (RILs) used in this study has been developed through single seed descent from F₂ plants, derived from a cross between PAC2 and RHA266. Our experiments were performed in two environments as follows:

a) Greenhouse experiment

Seventy-two RILs and their parents (PAC2 and RHA266) were grown in the greenhouse in plastic pots containing a mixture of 40% soil, 40% compost and 20% sand. Temperature was controlled at $25/18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (day/night), relative humidity was $65/85 \pm 5\%$ and light was provided to obtain 16h light period. The experiment consisted of a split-plot design with three blocks. The main plot was water treatment (well-watered and water-stressed) and subplot was genotype

(RILs and their parents). The RILs and their parents were randomized within each treatment-block combination. In order to simulate water deficit conditions similar to field, a progressive water stress was imposed at stage near flower bud formation (R1, Schneiter and Miller 1981) by progressively decreasing the irrigation to 30% of field capacity during 12 days. Water-stressed plants were then irrigated at 30% of field capacity until harvest. Well-watered (control) plants received sufficient water to maintain soil water content close to field capacity. Both well-watered and water-stressed plants were weighed to maintain the desired soil water content.

b) Field experiment

Ninety-seven RILs and their parents (PAC2 and RHA266) were grown in the field under both, irrigated and non-irrigated (rainfall) treatments. In each water treatment, three replications were designed and each replication consisted of two rows 4.6 m long, with 50 cm between rows and 25cm between plants in row. Thirty-two plants were obtained per plot. Well-watered treatment was irrigated two times at two critical stages: before flowering and during grain filling, determined according to sunflower irrigation programme in Toulouse–France region. Water stress treatment was not irrigated at all. Four plants per genotype per water treatment per replication were randomly chosen for our studies.

Trait measurements

A sample of 40 grams of sunflower seeds per genotype per water treatment per replication was ground in a Knifetec 1095 Sample Mill (FOOS, Höganäs, Sweden) three times for 10 s each. No sample material adhered to the walls of the mill because it was mixed at the intervals. A FOSS NIR System 6500 spectrophotometer (Foss Analytical, Denmark) was used to collect spectra from the milled sunflower seed samples using small round cup with a quartz window. 1000-grains weight (TGW) was measured for greenhouse and field experiments and 1000-kernel weight (TKW), 1000-hulls weight (THW) were measured only for field experiment. Liquid displacement method was used to determine seed density (SD) in the field experiment and 1000-grains per genotype per water treatment per replication were used for the trait. SD is calculated as 1000-grains weight/1000- grains volume.

Data analysis and QTL mapping

The data was analyzed using the SAS PROC GLM (SAS Institute Inc, NC, USA). A mixed model with water treatment as fixed effect, and genotypes (RILs and parents) as random effect was used for analysis of the data in the two conditions (greenhouse and field). Phenotypic correlations between traits in each water treatment were determined using SAS PROC CORR. Genetic gain (the difference between the mean of parents and the mean of the top 10% of selected RILs) was calculated for each traits.

The sunflower reference map recently constructed by Poormohammad Kiani et al. (2007) in our department, was used for detection of QTLs. This map contains 304 AFLP and 191 SSRs markers with mean density of 3.7 cM per locus. For mapping of QTLs and estimation of their effects, the method of composite interval mapping (CIM) model 6 on WINQTL CART (Version 2.5) was used (Wang et al. 2005). The control marker number and window size were 15 and 15 cM, respectively. Experiment-wise threshold level to declare linkage was calculated from 1000 permutations of each genotype marker against the phenotype in the population. Linkage was reported as significant if the two statistics for a marker were greater than the critical value at $P=0.05$ as described by Kassem et al. (2007).

Results

Phenotypic variation

Analysis of variance for RIL and their parents summarized in Table 1, show significant effects of water treatment for all the traits under both conditions except for %P and SD in the field. Differences among genotypes are also significant for all the traits, as well as for water treatment-genotype interaction. Genetic variability for the quality traits studied are presented in Table 2. The difference between the parents was significant for TGW under water-stress (WS) in greenhouse. The difference between the mean of RILs and the mean of parents was also significant for this trait under both water treatments in greenhouse (Table 2). Genetic gain presented as the difference between the mean of parents ($\bar{X}P$) and the mean of 10% selected RILs ($\bar{X}10\%RIL$) was significant for all the traits in all conditions except for SD in water-stressed plants (Table 2).

QTL mapping

The map position and characteristics of QTLs associated with the studied traits in the greenhouse and in the field are summarized in Tables 3 and 4. QTLs were designated by 1, 2, 3 and 4 for the greenhouse well-watered, greenhouse water-stressed, field well-watered and field water-stressed conditions respectively, followed by the abbreviation of the trait, the corresponding linkage group and the number of QTL in the group. For an easier overview of overlapping QTLs between traits and growth conditions, an image of all QTL regions is presented in Fig 1. The phenotypic variances explained by the QTLs for %P ranged from 3% to 17%. The most important QTLs for %P (1. %P.17.1 and 2. %P.12.2) with $R^2=17\%$ are located on linkage groups 17 and 12 in the greenhouse conditions. The positive alleles controlling %P under well-watered condition on linkage group 17 come from RHA266 and for the other one under water-stressed located on linkage group 12 come from PAC2. Several QTLs were identified for 1000

grains weight (TGW). Most of them are located on linkage groups 10 and 17. On linkage group 10, an important QTL with the phenotypic variance 28% (*1.TGW.10.3*), is controlled by RHA226 alleles. 18 QTLs were detected for TKW under all conditions. The most important (*3.TKW.5.1* and *4.TKW.5.1*) with a phenotypic variance of 17 and 20% are located on linkage group 5. The maximum value of phenotypic variation explained by the QTL controlling THW is 17% (*3.THW.5.1*). Positive alleles for most of the QTLs come from RHA266. 16 QTLs for SD were identified, five through them are located on linkage group 16 and the favourable alleles of the QTLs in this linkage group come from PAC2. The most important phenotypic variance was 20% for “*3.SD.16.3*” on linkage group 16 under well-watered condition.

Discussion

Phenotypic variation among genotypes

Water-stress affected seed quality traits in the greenhouse and in the field except for seed density (SD). In addition, water treatment responses were affected by significant ‘genotype-water treatment’ interaction, suggesting that response to water-stress by a given genotype in relation to other genotypes varies between water treatments (Table 1). Significant differences between the parents for the studied grain quality traits under water-stress in greenhouse suggest the ability of RHA266 to water stress tolerance (Table 2). Transgressive segregation occurred for all traits, and the comparison between the mean of the top 10% selected RILs with the mean of the parents showed significant differences for all traits under both conditions except for SD under water-stress (Table 2). This phenomenon is reported by Mokrani et al. (2002) and Al-Chaarani et al. (2004) for TGW in sunflower inbred lines. Transgressive segregation can be the result of accumulation of positive alleles coming from different parental lines. The positive and negative signs of additive effects at the different loci (Tables 3 and 4) indicate the contribution of both parental lines and confirm the transgressive segregation observed at the phenotypic level.

QTL analysis

The QTLs identified in the present study underlined that several putative genomic regions are involved in seed quality traits under water treatments (Tables 3 and 4). The sign of additive effects shows that alleles having positive effects for QTLs come from both ‘PAC2’ and ‘RHA266’ parents. Their recombination resulted in RILs with higher values than those of their parents, which is explained by various positive gene effects having been accumulated (Table 2). The percentage of phenotypic variance explained by the QTLs (R^2) ranged from 3% to 28%. An overlapping QTL for %P (*1. %P.17.1* and *3. %P.17.1*) was detected on linkage group 17 under both well-watered conditions (field and greenhouse) which is considered as a specific loci

controlling %P under well-watered condition. Overlapping QTL for %P was also detected under water-stressed conditions in both environments (field and greenhouse). This specific water-stress QTL was located on linkage group 13 (2.%P.13.1 and 4. %P.13.1). The favourable alleles for the QTL in this region come from PAC2 which confirm the ability of PAC2 for increasing protein content under water-stressed condition. A genomic region for %P was detected on linkage group 14 which have not interaction with water treatments in greenhouse conditions. Three QTLs for %P which were overlapped under well-watered and water-stressed conditions in this region (1.%P.14.1 , 2.%P.14.1 and 3.%P.14.1) and RHA266 alleles increase %P for all these QTLs. Several specific QTLs for %P were found on most of linkage groups; but linkage group 14 was the more important for controlling %P with 5 QTLs for the trait in all conditions. In several cases, one QTL was found to be associated with more than one trait. Four chromosomal regions on linkage groups 1, 8, 10 and 16, where QTLs of protein content were overlapped with the QTLs of oil content identified by Tang et al. (2006) and Ebrahimi et al. (2008). These QTL pairs are likely to represent genes involved in protein synthesis with indirect effect on oil content or genes controlling substrate partitioning between oil and protein synthesis. An important SSR marker *ORS407* in linkage group 16 control oil and protein content with opposite effects in sunflower. QTLs of seed oil and protein content have been reported before to be closely linked, indicating loci with pleiotropic effects on both traits. Gül et al. (2003) identified six QTLs for oil content in *B. napus* and four of these QTLs were closely linked to QTLs of protein content. At three of these loci, increasing oil content was in coupling phase with the alleles decreasing protein content and vice versa. In soybean, Lee et al. (1996) identified various common markers on five linkage groups, which were associated with both, seed protein and oil content. Oil and protein are major constituents of the seed and their contents are usually expressed in relation to total seed mass; increasing one compound has to decrease another compound (Zhao et al. 2006). On linkage group 10 an overlapping QTL (1.TGW.10.3 and 3.TKW.10.1) was observed for TGW and TKW. This overlapped QTL was specific for well-watered condition in the field and greenhouse. This region probably control TKW and affects TGW trait. The phenotypic variance of this QTL is quite high ($R^2 = 28\%$) in the greenhouse. The favourable alleles for both QTLs come from RHA266 which is also reported as the parent with favourable alleles for TGW by Al-Chaarani et al. (2004). Four non specific QTLs (common between well-watered and water-stress conditions) were detected on linkage group 2, 5 and 8 for TKW trait. All favourable alleles for these QTLs come from RHA266 which show the importance of this parent controlling TKW under both conditions. Five regions were identified on linkage groups 3, 5, 6, 10 and 17 where QTLs of TGW or TKW are co-located with QTLs of THW trait. The most important ones are on

linkage group 5, where two QTLs of TKW (*3.TKW.5.1* and *4.TKW.5.1*) are overlapped with two QTLs of THW (*3.THW.5.1* and *4.THW.5.1*) under both water treatments in the field. RHA266 alleles increase the quantity of TKW and THW. This linkage group (LG 5) was also reported by Tang et al. (2006) for a QTL co-located with pericarp and kernel weight. There are several specific QTLs for TGW and THW traits in all conditions. Ten QTLs for TGW and THW are detected on linkage group 17, which show the importance of LG17 for these traits. On this linkage group the QTL *1.TGW.17.4* linked to *ORS677* SSR marker is also reported by Tang et al. (2006) for pericarp weight and seed length. Another QTL, *1.TGW.14.1* (*ORS578* marker) on linkage group 14 is also reported by Tang et al. (2006) for 100 seed weight.

As far as we know seed density (SD) in sunflower is not reported in the literature. 8 SSR markers (*SSL66_2*, *ORS333*, *HA3582*, *HA3683*, *ORS31_3*, *HA3039*, *ORS899* and *SSL22_3*) associated with SD are detected in our study. One of them (*ORS899*) is common with the QTLs of osmotic potential at full turgor reported by Poormohammad Kiani et al. (2007). Probably, “*ORS899*” marker which controls osmotic potential at full turgor has an effect on the weight and volume of the grain. More over we identified two QTLs (*3.SD.4.1*) under well-watered and (*4.SD.12.1*) under water-stressed for SD which are reported for turgor potential and osmotic adjustment traits by Poormohammad Kiani et al. (2007). We suggest that “*4.SD.12.1*” reflects an adaptive response resulting in drought tolerance caused by common marker linked with osmotic adjustment. SSR marker *ORS333* is linked to SD which is also associated with seed oleic acid content reported in our previous research under well-watered condition (Ebrahimi et al. 2008). The later common QTLs suggested the negative correlation between SD and oil content (Zimmerman 1962). The favourable alleles come from different parental lines in our study. Another common QTL linked to SSR marker “*HA3039*” was detected for SD in present study linked with fatty acid traits in our previously study (Ebrahimi et al. 2008). An overlapping between QTLs of SD and %P in linkage group 15 (*1.%P.15.1* and *3.SD.15.1*) was also detected. The positive alleles for both traits (SD and %P) come from “RHA266”. Therefore this loci probably present pleiotropic effects on SD and %P traits. Li and Burton (2002) also reported positive correlation between seed density and protein content in soybean. Seed density could potentially be used for indirect selection of protein content (Hartwig and Collins, 1962). A regression of seed density on protein concentration for 41 standard soybean calibration samples was linear (Li, 1996). Two co-located QTLs for SD with THW and TGW were identified on linkage group 12 (*4.THW.12.1* and *4.SD.12.1* and *3.SD.12.1*) and 17 (*2.TGW.17.1* and *3.SD.17.1*) which explain the relation between these traits. The favourable alleles for TGW and SD come from “RHA266” whereas those for SD and THW come from both parental lines.

Usually QTLs of SD trait present interaction with environment and only two non-specific QTLs (*3.SD.12.1* with *4.SD.12.2* and *3.SD.16.1* with *4.SD.16.2*) for well-watered and water-stressed conditions are detected in this study.

The present research work enabled us to investigate the genetic basis of trait association by looking for co-location of corresponding QTLs on the genetic map under two water regimes. Apart from increasing understanding of the genetic complexity of traits, the major output of the QTL analysis is identification of relevant genomic regions for drought tolerance to be included in breeding programmes. Moreover we found markers which have not interaction with water treatments such as *E35M60-4* which controls TKW as well as the SSR markers *ORS671-2* and *HA2714* which affect %P in greenhouse conditions (Table 5). Several markers are also detected for THW common in two environments (Table 5). The most important is *ORS1040* which is common under well-watered and water-stressed conditions in the field experiment. Stable QTLs across water treatments are involved in the expression of seed quality traits without being affected by water treatment. Thirteen stable QTLs were identified for seed protein content and grain weight traits in our study (Table 6). For example three stable QTLs observed for %P could be used to improve the level of %P in different environmental conditions. We suggest that both stable and specific QTLs should be considered in breeding programmes. However, most of the QTLs identified were specific for one water treatment, which could be of interest for marker-assisted selection when favourable alleles are selected. We also suggest that specific QTLs may correspond to stress-induced gene(s) and their differential expression contributes to drought tolerance.

Acknowledgments

This research was support by Gundishapur project No. 12267RD. The authors thank the French and Iranian ministries of research for providing funds and the necessary facilities.

References

- Al-Chaarani, G.R., Roustae, L., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Barrault, G., Dechamp-Guillaume, G., and Sarrafi, A. 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theor. Appl. Genet.* **104**: 490–496.
- Al-Chaarani, G.R., Gentzbittel, L., Huang, X.Q., and Sarrafi, A. 2004. Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **109**: 1353–1360. doi:10.1007/s00122-004-1770-1. PMID:15365625.
- Baldini, M., Vannozzi, G.P., Bervillé, A., and Tersac, M. 1999. Yield relationships under drought in sunflower genotypes obtained from a wild population and cultivated sunflowers in rain-out shelter in large pots and field experiments. *Helia*, **22**: 81–96.
- Bert, P.F., Jouan, I., Tourvielle de Labrouhe, D., Serre, F., Nicolas, P., and Vear, F. 2002. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theor. Appl. Genet.* **105**: 985–993.
- Connor, D., and Hall, A.J. 1997. Sunflower physiology. *In* Sunflower Technology and Production, *Edited by* A.A. Schneiter. American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America, Madison. pp. 113–182.
- Dwivedi, S.L., Nigam, S.N., Rao, R.C.N., Singh, U., and Rao, K.V.S. 1996. Effect of drought on oil, fatty acids and protein contents of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *Field Crops Res.* **48**: 125–133. doi:10.1016/S0378-4290(96)01027-1.
- Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Poormohammad Kiani, S., Nabipour, A., Shariati, F., Grieu, P., and Sarrafi, A. 2008. QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. *Genome*, **51**: 599–615.
- Fehr, W.R., and Weber, C.R. 1968. Mass selection by seed size and specific gravity in soybean populations. *Crop Sci.* **8**: 551–554.
- Felde, T.Z., Becker, H.C., and Möllers, C. 2006. Genotype 3 Environment Interactions, Heritability, and Trait Correlations of Sinapate Ester Content in Winter Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Crop Sci.* **46**: 2195–2199.

- Flores Berrios, E., Gentzbittel, L., Kayyal, H., Alibert, G., and Sarrafi, A. 2000a. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theor. Appl. Genet. **101**: 1299–1306.
- Flores Berrios, E., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Alibert, G., and Sarrafi, A. 2000b. Genetic control of early events in protoplast division and regeneration pathways in sunflower. Theor. Appl. Genet. **101**: 606–612.
- Flores Berrios, E., Sarrafi, A., Fabre, F., Alibert, G., and Gentzbittel, L. 2000c. Genotypic variation and chromosomal location of QTLs for somatic embryogenesis revealed by epidermal layers culture of recombinant inbred lines in the sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theor. Appl. Genet. **101**:1307-1312.
- González-Pérez, S., and Vereijken, J.M. 2007. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. Rev. J. Sci. Food Agric. **87**:2173- 2191.
- Gül, M.K. 2002. QTL-Kartierung und Analyse von QTL x Stickstoff Interaktionen beim Winterraps (*Brassica napus* L.). Ph.D. thesis. Universitaet Göttingen, Germany, pp. 34-38.
- Gül, M.K., Becker, H.C., and Ecke, W. 2003. QTL mapping and analysis of QTL x nitrogen interactions for protein and oil contents in *Brassica napus* L. In Proceedings of the 11th Int. Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark, 6 July 2003. pp. 91-93.
- Hartwig, E.E., and Collins, F.I. 1962. Evaluations of density classification as a selection technique in breeding soybeans for protein or oil. Crop Sci. **2**:159–162.
- Kassem, A.M., Meksem, K., Wood, A.J., and Lightfoot, D.A. 2007. A microsatellite map developed from late maturity germplasm ‘Essex’ by ‘Forrest’ detects four QTL for soybean seed yield expected from early maturing germplasm. Rev. Biol. Biotech. **6**: 11–19.
- Lee, S.H., Bailey, M.A., Mian, M. A.R., Carter, T.E. Jr, Shipe, E.R., Ashley, D.A, Parrot, W.A., Hussey, R.S., and Boerma, H.R. 1996. RFLP loci associated with soybean seed protein and oil content across populations and locations. Theor. Appl. Genet. **93**: 649–657.
- Leon, A.J., Andradeb, F.H., and Lee, M. 2003. Genetic analysis of seed-oil concentration across generations and environments in sunflower. Crop Sci. **43**: 135–140.
- Li, H. 1996. Selection for seed density as a method for indirectly increasing soybean seed protein concentration. M.S. Thesis. North Carolina State Univ., Raleigh, NC.
- Li, H., and Burton, J.W. 2002. Selecting Increased Seed Density to Increase Indirectly Soybean Seed Protein Concentration. Crop Sci. **42**: 393-398.
- Mestries, E., Gentzbittel, L., Tourvieille de Labrouhe, D., Nicolas, P., and Vear, F. 1998. Analysis of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. Mol. Breed. **4**: 215–226.

- Mokrani, L., Gentzbittel, L., Azanza, F., Fitamant, L., Al-Chaarani, G., and Sarrafi, A. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **106**: 149–156. doi:10.1007/s00122-002-1011-4. PMID: 12582883.
- Ozturk, A., and Aydin, F. 2004. Effect of water stress at various growth stages on some quality characteristics of winter wheat. *J. Agron. Crop Sci.* **190**: 93-99.
- Poormohammad Kiani, S., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A., Nishinakamasu, V., Hopp, E., Gentzbittel, L., Paniego, N., and Sarrafi, A. 2007. Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci.* **172**: 773–787. doi:10.1016/j.plantsci.2006.12.007.
- SAS Institute Inc. 1996. SAS/STAT user's guide, version 6, 4th ed., Vols. 1 and 2. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Schneider, A.A., and Miller, J.F. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* **21**: 901-903.
- Sosulski, F.W. 1979. Food uses of sunflower proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **56**:438–442.
- Specht, J.E., Chase, K., Macrander, M., Graef, G.L., Chung, J., Markwell, J.P., Germann, M., Orf, J.H., and Lark, K.G. 2001. Soybean response to water: A QTL analysis of drought tolerance. *Crop Sci.* **41**: 493-509.
- Sujatha, H.L., Chikkadevaiah and Nandini, R. 2002. Genetic variability study in sunflower inbreds. *Helia*, **37**: 93-100.
- Tang, S., Yu, J.K., Slabaugh, M.B., Shintani, D.K., and Knapp, S.J. 2002. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor. Appl. Genet.* **105**:1124–1136.
- Tang, S., Leon, A., Bridges, W.C., and Knapp, S.J. 2006. Quantitative trait loci for genetically correlated seed traits are tightly linked to branching and pericarp pigment loci in sunflower. *Crop Sci.* **46**: 721–734. doi:10.2135/cropsci2005.0006-7.
- Triboï, E., Martre, P., and Triboï-Blondel, A.M. 2003. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *J. Exp. Bot.* **54**: 1731-1742.
- Unger, P.W. 1982. Time and frequency of irrigation effects on sunflower production and water use. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **46**: 1072-1076.
- Wang, S., Basten, C.J., and Zeng, Z.B. 2005. Windows QTL Cartographer V2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, N.C.. Available from <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>.

- Yu, J.K., Tang, S., Slabaugh, M.B., Heesacker, A., Cole, G., Herring, M., Soper, J., Han, F., Chu, W.C., Webb, D.M., Thompson, L., Edwards, K.J., Berry, S., Leon, A., Olungu, C., Maes, N., and Knapp, S.J. 2003. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Sci.* **43**: 367–387.
- Zhao, J.Y., Becker, H.C., Zhang, D.Q., Zhang, Y.F., and Ecke, W. 2006. Conditional QTL mapping of oil content in rapeseed with respect to protein content and traits related to plant development and grain yield. *Theor. Appl. Genet.*, **113**: 33-38.
- Zimmerman, D.C. 1962. The relationship between seed density and oil content in flax. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **39**: 77-78.

Table 1. Mean squares of analysis of variance for seed quality traits in recombinant inbred lines (RILs) of sunflower

	df		%P ^a		TGW ^b		TKW ^b	THW ^b	SD ^c
	Greenhouse	Field	Greenhouse	Field	Greenhouse	Field	Field	Field	Field
Water treatment	1	1	373.30*	0.87	13330.55***	3223.51**	500.35***		0.02
Block	2	2	8.69	13	1.22	80.87	10.01*		0.02
Block×water treatment	2	2	5.66	23.16***	6.06	10.92	0.34		0.002
Genotype (RIL)	71	98	17.20***	20.36***	387.29***	1248.86***	204.93***		0.04***
RIL*Water treatment	71	98	5.80***	2.57*	111.29***	34.12***	11.52***		0.02***
Error	284	392	2.27	1.86	7.33	16.64	4.17		0.01

%P, percentage of protein; TGW, 1000 grains weight; TKW, 1000 kernels weight; THW, 1000 hulls weight; SD, seed density.

*, **, and ***, significant at probability levels of 0.05, 0.01, and 0.001 respectively.

^a % of grain.

^b in gr.

^c in gr.cm⁻³

Table 2. Genetic variability and genetic gain for seed quality traits in sunflower under well-watered (WW) and water-stressed (WS) conditions in the field and the greenhouse.

	%P ^a				TGW ^b		TKW ^b		THW ^b		SD ^c	
	Greenhouse		Field		Greenhouse		Field		Field		Field	
	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS
PAC2 (P1)	25.01	24.23	23.64	23.72	23.50	17.34	47.95	39.30	16.65	11.83	0.62	0.78
RHA266 (P2)	24.18	26.79	23.32	25.52	27.51	25.30	56.50	44.66	13.00	11.73	0.63	0.67
P1 - P2	0.83 ^{NS}	-2.56 ^{NS}	0.32 ^{NS}	-1.80 ^{NS}	-4.01 ^{NS}	-7.96 *	-8.55 ^{NS}	-5.36 ^{NS}	3.65 ^{NS}	0.10 ^{NS}	-0.01 ^{ns}	0.11 ^{ns}
$\bar{X}P = (P1 + P2)/2$	24.60	25.51	23.48	24.62	25.51	21.32	52.23	41.98	14.83	11.78	0.62	0.72
$\bar{X}RIL$	25.17	27.03	23.84	23.91	36.77	25.66	46.01	41.35	13.61	11.78	0.71	0.72
$\bar{X}RIL - \bar{X}P$	0.57 ^{NS}	1.52 ^{NS}	0.36 ^{NS}	-0.71 ^{NS}	11.26 *	4.34 *	-6.21 ^{NS}	-0.63 ^{NS}	-1.21 ^{NS}	0.00 ^{NS}	0.09 ^{ns}	0.00
$\bar{X}10\%SRIL$	28.76	30.19	26.97	27.27	58.48	38.46	77.37	72.49	27.01	24.46	0.93	0.83
GG10% = $\bar{X}10\%SRIL - \bar{X}P$	4.16 *	4.68 *	3.49 *	2.65 *	32.97 *	17.14 *	25.15 *	30.51 *	12.19 *	12.68 *	0.31*	0.11 ^{ns}

%P, percentage of protein; TGW, 1000 grains weight; TKW, 1000 kernels weight; THW, 1000 hulls weight; SD, seed density. PAC2 (P1) and RHA266 (P2), parental lines; $\bar{X}P$: mean of two parental lines; $\bar{X}RIL$: mean of recombinant inbred lines (RILs); $\bar{X}10\%SRIL$: the mean of the top 10% selected RILs; GG10%: genetic gain when the mean of the top 10%selected RILs is compared with the mean of the parents. * Significant at 0.05 probability level; NS: non-significant.

^a% of grain

^b in gr.

^c in gr.cm⁻³

Table 3. Map position and effect of QTLs for percentage of grain protein (%P) and 1000 grains weight (TGW), detected in RILs in the greenhouse under well-watered and water-stressed conditions.

QTL	Marker	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²	QTL	Marker	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²
1.%P.3.1	E38M50_18	19.2	3.81	-0.59	0.06	2.%P.1.1	E33M48_16	30.6	9.16	0.86	0.11
1.%P.4.1	ORS671_1	83.9	3.63	-0.62	0.05	2.%P.4.1	E41M62_12	44.2	7.06	-0.56	0.08
1.%P.6.1	E40M59_3	11.8	4.21	-0.60	0.06	2.%P.5.1	E40M62_8	5.6	3.26	-0.42	0.03
1.%P.7.1	E33M60_7	34.8	4.12	-0.88	0.06	2.%P.8.1	E37M47_3	93.0	7.42	-0.65	0.09
1.%P.12.1	ORS671_2	19.1	3.33	0.69	0.07	2.%P.12.1	ORS671_2	19.1	6.37	0.74	0.14
1.%P.14.1	HA2714	21.6	6.00	-1.02	0.13	2.%P.12.2	E38M50_6	30.9	11.48	0.82	0.17
1.%P.15.1	E32M49_25	70.3	6.06	-0.83	0.11	2.%P.13.1	HA2598	34.0	3.18	0.43	0.05
1.%P.17.1	E41M50_10	75.0	8.13	-0.96	0.17	2.%P.14.1	HA2714	21.6	3.69	-0.49	0.06
1.TGW.3.1	HA2920	44.4	3.90	-3.16	0.07	2.%P.14.2	ORS1152_1	77.1	3.84	-0.48	0.04
1.TGW.9.1	E40M50_19	88.2	9.30	6.23	0.23	2.%P.14.3	E37M47_24	97.0	5.17	0.82	0.10
1.TGW.9.2	E32M61_6	95.1	13.02	6.58	0.24	2.TGW.2.1	E36M59_7	12.9	11.29	0.34	0.16
1.TGW.9.3	E32M47_8	104.1	3.41	4.09	0.13	2.TGW.2.2	E35M60_23	24.9	6.18	0.32	0.13
1.TGW.10.1	E37M61_6	61.4	6.35	5.66	0.11	2.TGW.2.3	E33M48_4	87.5	5.72	-0.20	0.06
1.TGW.10.2	E35M60_12	71.7	5.89	-5.84	0.25	2.TGW.4.1	E41M62_6	0.0	3.09	0.17	0.04
1.TGW.10.3	E35M48_8	80.4	11.54	-7.21	0.28	2.TGW.7.1	E32M49_11	41.0	4.60	-0.24	0.10
1.TGW.10.4	ORS591	101.2	3.78	-5.20	0.14	2.TGW.10.1	ORS878	12.4	3.02	0.17	0.04
1.TGW.11.1	E35M48_3	30.4	5.17	4.12	0.10	2.TGW.17.1	ORS31_3	0.0	5.01	-0.22	0.06
1.TGW.14.1	ORS578	3.6	6.14	-4.39	0.14	2.TGW.17.2	E38M50_21	20.5	6.90	0.31	0.14
1.TGW.17.1	E33M50_3	49.0	7.03	5.67	0.18	2.TGW.17.3	E35M62_8	110.1	5.15	-2.24	0.06
1.TGW.17.2	E41M50_10	75.0	5.53	6.83	0.23						
1.TGW.17.3	E33M50_4	89.8	8.52	6.69	0.18						
1.TGW.17.4	ORS677	114.1	7.36	-6.55	0.15						

QTLs are named as follows: a number indicating the conditions (1, well-watered greenhouse; 2, water-stressed greenhouse) followed by an abbreviation for the trait, the corresponding linkage group, and the number of QTLs in the linkage group. R², proportion of individual phenotypic variance explained by the QTL.

Table 4. Map position and effect of QTLs for percentage of grain protein (%P), 1000 kernels weight (TKW), 1000 hulls weight (THW) and seed density (SD), detected in RILs in the field under well-watered and water-stressed conditions.

QTL	Marker	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²	QTL	Marker	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²
3.%P.2.1	E32M61_2	72.9	3.84	-0.52	0.07	4.%P.10.1	E37M49_4	49.4	4.21	-0.85	0.07
3.%P.8.1	E38M48_9	33.1	4.48	-0.61	0.09	4.%P.10.2	E35M60_5	122.0	3.18	0.76	0.05
3.%P.9.1	HA2564	37.3	3.24	0.61	0.06	4.%P.11.1	ORS5_1	14.3	3.56	0.59	0.07
3.%P.9.2	E40M47_13	125.8	3.86	-0.81	0.12	4.%P.13.1	E33M48_20	24.9	3.58	0.60	0.08
3.%P.10.1	SSL133	6.9	3.67	-0.63	0.09	4.%P.15.1	E33M48_6	80.1	5.70	-0.73	0.11
3.%P.14.1	HA293	27.9	3.39	-0.66	0.10	4.%P.16.1	ORS407	143.6	3.35	-0.53	0.06
3.%P.17.1	E41M50_10	75.0	3.31	-0.64	0.11	4.TKW.2.1	E33M48_4	87.5	4.03	-0.27	0.05
3.%P.17.2	E35M48_7	94.1	3.42	-0.51	0.06	4.TKW.2.2	E35M60_4	94.6	6.17	-0.32	0.08
3.TKW.2.1	E33M48_4	87.5	6.57	-0.37	0.09	4.TKW.5.1	E41M59_10	29.9	14.73	-0.61	0.20
3.TKW.2.2	E35M60_4	94.6	8.29	-0.41	0.11	4.TKW.6.1	E41M48_2	18.5	4.90	-0.27	0.05
3.TKW.3.1	E38M60_9	22.0	3.39	0.24	0.03	4.TKW.8.1	E37M47_19	40.2	7.57	-0.39	0.10
3.TKW.4.1	E35M62_1	67.8	3.38	0.34	0.06	4.TKW.14.1	ORS1086_1	79.1	3.24	0.26	0.04
3.TKW.5.1	E41M59_10	29.9	12.99	-0.71	0.17	4.TKW.14.2	E37M61_3	118.4	3.81	-0.31	0.04
3.TKW.8.1	ORS1043	3.8	3.36	0.27	0.04	4.TKW.16.1	E37M47_5	84.8	3.78	-0.24	0.04
3.TKW.8.2	E37M47_19	40.2	4.26	-0.31	0.05						
3.TKW.10.1	E35M48_8	80.4	4.34	-0.38	0.05						
3.TKW.10.2	E41M50_3	115.6	4.70	0.49	0.05						
3.TKW.16.1	HA2193	122.6	3.79	-0.3	0.04						

QTLs are named as follows: a number indicating the conditions (3, well-watered field; 4, water-stressed field) followed by an abbreviation for the trait, the corresponding linkage group, and the number of QTLs in the linkage group. R², proportion of individual phenotypic variance explained by the QTL.

Table 4 (continued).

QTL	Marker	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²	QTL	Marker	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²
3.THW.2.1	E38M50_26	57.3	3.26	-0.26	0.06	4.THW.3.1	E40M59_13	9.6	3.63	0.18	0.04
3.THW.4.1	E41M62_12	44.2	3.38	0.21	0.05	4.THW.3.2	ORS657	50.3	3.07	0.19	0.05
3.THW.5.1	E41M59_10	29.9	12.97	-0.56	0.17	4.THW.5.1	E41M59_10	29.9	7.47	-0.38	0.09
3.THW.6.1	E32M49_21	15.5	5.86	-0.29	0.09	4.THW.10.1	E35M48_5	131.4	3.69	-0.29	0.04
3.THW.8.1	ORS329	86.9	3.94	-0.24	0.06	4.THW.11.1	E38M50_24	70.5	4.86	0.27	0.08
3.THW.8.2	E33M48_14	97.6	4.54	-0.26	0.07	4.THW.12.1	E35M61_2	5.0	5.49	0.23	0.07
3.THW.10.1	E37M61_6	61.4	8.29	0.43	0.09	4.THW.12.2	SSL268	70.3	4.87	-0.25	0.08
3.THW.10.2	E35M48_5	131.4	8.12	-0.47	0.10	4.THW.13.1	SSU39	83.8	3.88	-0.21	0.04
3.THW.10.3	E32M49_35	143.0	6.05	-0.61	0.12	4.THW.17.1	E35M48_7	94.1	3.26	-0.27	0.07
3.THW.15.1	E35M48_4	82.4	4.26	-0.33	0.13	4.THW.17.2	ORS1040	120.9	3.91	0.27	0.08
3.THW.17.1	ORS1040	120.9	4.45	0.24	0.05	4.SD.1.1	E40M50_18	17.7	3.20	0.02	0.06
3.SD.3.1	E41M48_11	39.4	4.17	0.03	0.07	4.SD.10.1	HA3039	172.7	5.04	-0.04	0.12
3.SD.4.1	E32M49_28	71.8	8.34	-0.06	0.18	4.SD.12.1	E40M50_9	2.0	4.09	-0.03	0.08
3.SD.10.1	SSL66_2	154.7	4.47	-0.04	0.07	4.SD.14.1	E38M50_22	63.4	3.87	-0.02	0.06
3.SD.12.1	E35M61_2	5.0	4.31	-0.03	0.07	4.SD.16.1	ORS899	18.7	7.72	0.04	0.14
3.SD.13.1	E36M59_18	8.0	4.07	0.04	0.12	4.SD.16.2	SSL22_3	33.0	3.12	0.02	0.06
3.SD.15.1	E33M60_6	72.6	3.47	-0.03	0.05						
3.SD.16.1	ORS333	4.8	5.47	0.04	0.10						
3.SD.16.2	HA3582	13.9	3.23	0.04	0.08						
3.SD.16.3	HA3683	109.0	9.78	0.06	0.20						
3.SD.17.1	ORS31_3	2.0	3.43	-0.03	0.06						

Table 5. Percentage of individual phenotypic variance explained by non specific QTLs on all the linkage groups under well-watered greenhouse, water-stressed greenhouse, well-watered field and water-stressed field conditions.

Trait	Marker	Greenhouse		Field	
		Well-watered	Water-stressed	Well-watered	Water-stressed
%P	ORS671_2	0.07	0.14	-	-
	HA2714	0.13	0.06	-	-
	E41M50-10	0.17	-	0.11	-
TGW and TKW	E35M48-8	0.28	-	0.05	-
	E33M48-4	-	0.06	0.09	0.05
	E35M60-4	-	-	0.11	0.08
	E41M59-10	-	-	0.17	0.20
	E37M47-19	-	-	0.05	0.10
	ORS1040	-	-	0.05	0.08
	E41M59-10	-	-	0.17	0.09
THW	E35M48-5	-	-	0.10	0.04
	ORS1040	-	-	0.05	0.08

%P, percentage of protein; TGW, 1000 grains weight; TKW, 1000 kernels weight; THW, 1000 hulls weight.

Table 6. Number of QTLs detected for each trait in each water treatment (WW, well-watered; WS, water-stressed) as well as number of QTLs in common between water treatments and phenotypic correlation coefficient between water treatments.

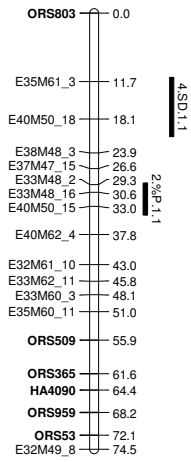
	No. of QTLs detected		No. of common QTLs	Phenotypic correlation
	WW	WS		
%P	16	16	3	0.52***
TGW	14	9	1	0.58***
TKW	10	8	4	0.86***
THW	11	10	3	0.83***
SD	10	6	2	0.17**

%P, percentage of protein; TGW, 1000 grains weight; TKW, 1000 kernels weight; THW, 1000 hulls weight; SD, seed density.

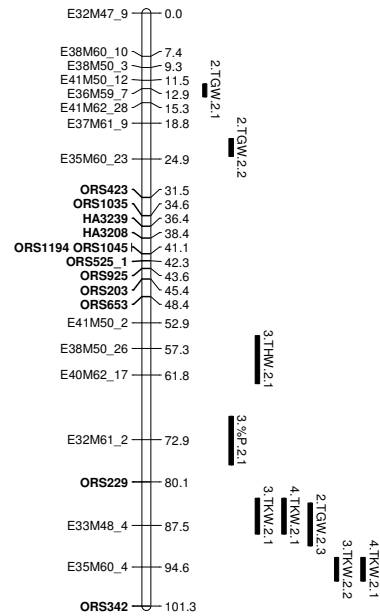
*** Significant at 0.001 probability level.

Fig. 1. Improved molecular genetic linkage map of sunflower based on 304 AFLP and 191 SSR markers using 123 ‘PAC2’ × ‘RHA266’ recombinant inbred lines (RILs). The positions of the QTLs are shown on the right side of the linkage groups. Bars represent intervals associated with the QTLs. The numbers at the beginning of QTL names indicate the conditions: 1, well-watered greenhouse; 2, water-stressed greenhouse; 3, well-watered field; 4, water-stressed field. %P, percentage of protein; TGW, 1000 grains weight; TKW, 1000 kernels weight; THW, 1000 hulls weight; SD, seed density.

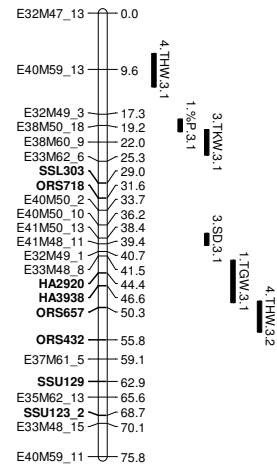
1



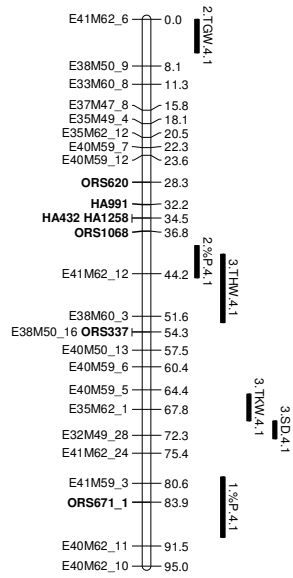
2



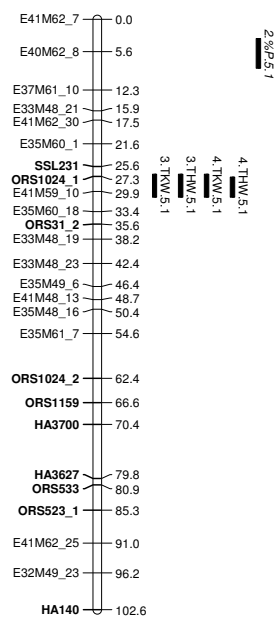
3



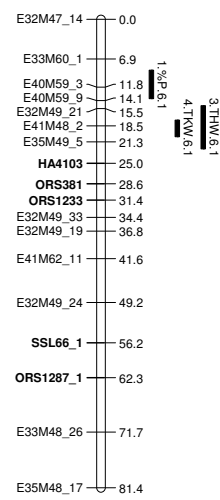
4



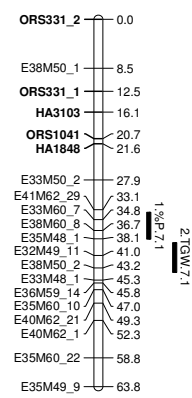
5

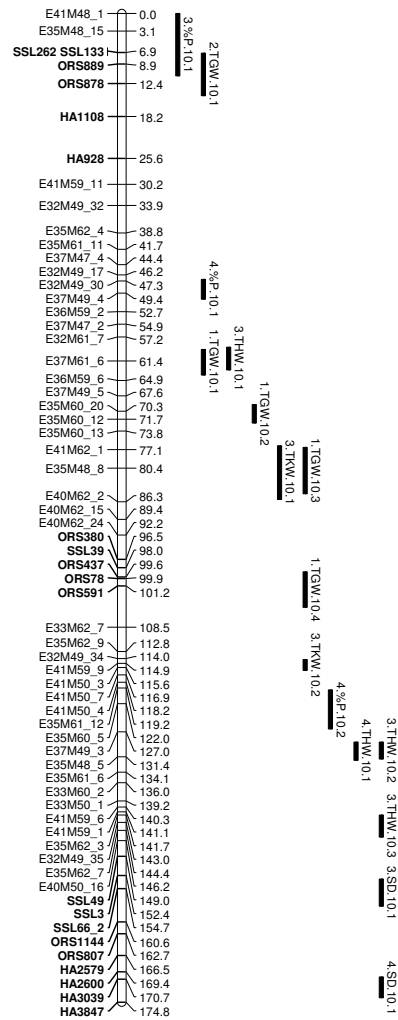
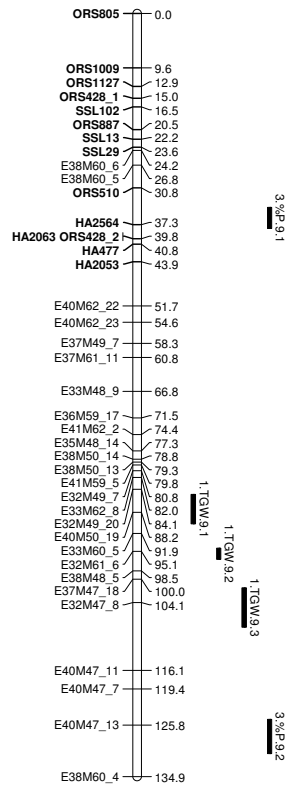
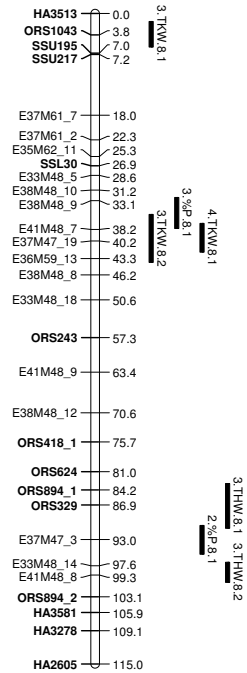


6

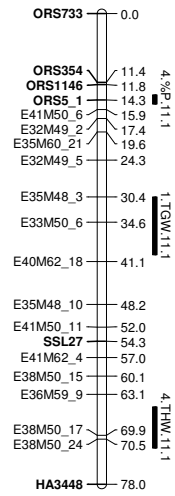


7

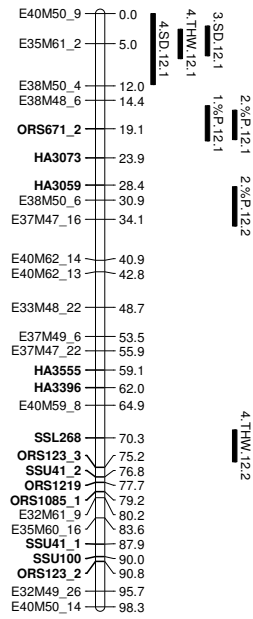




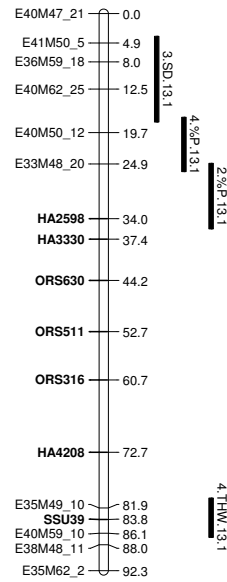
11



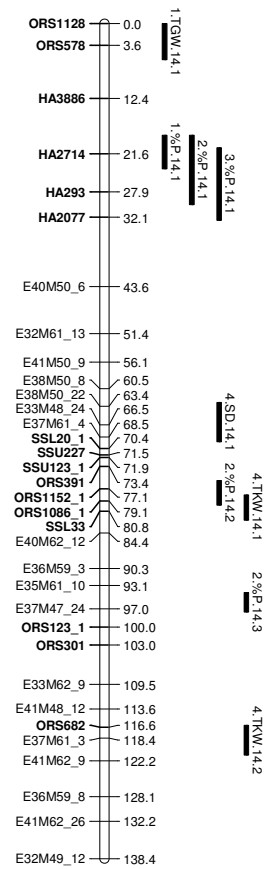
12



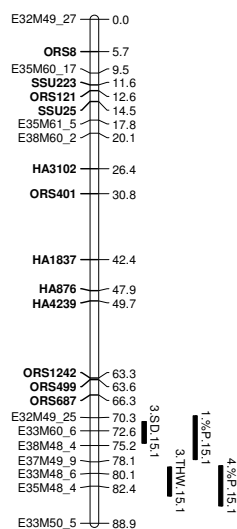
13



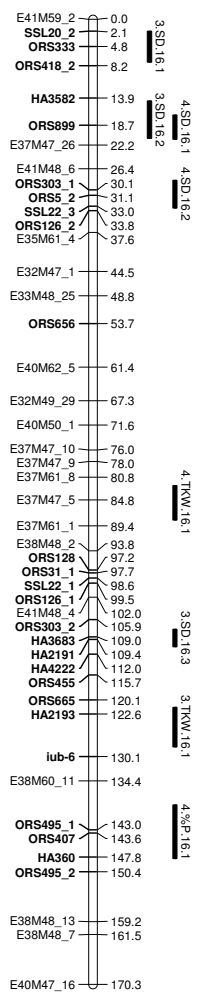
14



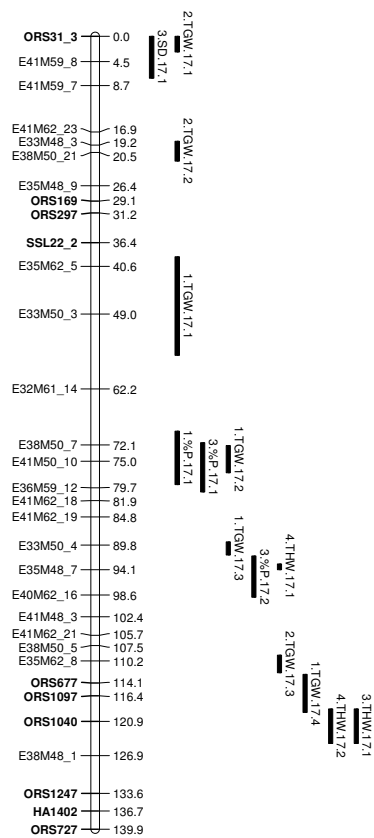
15



16



17



4.2. Synthèse des résultats et conclusion

4.2.1. Variation phénotypique de la population de LIRs

L'analyse de variance effectuée sur les 100 lignées recombinantes (LIRs) utilisées pour le test de germination montre qu'il existe un effet significatif du traitement hydrique pour les paramètres de germination (Article 1, Tableau 1-page 49). Nous pouvons noter que les différences entre les génotypes sont largement significatives. Le pourcentage de germination (PSG) diffère significativement sous contrainte hydrique entre les deux parents, indiquant des capacités différentielles de ces génotypes pour la germination en condition sèche (Article 1, Tableau 2-page 50). Par contre, les deux parents ne diffèrent pas de manière significative pour le pourcentage de germination en condition normale. Selon ces résultats, il est probable que les gènes responsables de la germination sous la contrainte hydrique pourraient être différents de ceux responsables de la germination en condition normale (Article 1, Tableau 2-page 50). Le gain génétique, calculé à partir de la différence entre la moyenne des meilleures lignées recombinantes sélectionnées (10%) par rapport à la moyenne des parents, est significatif pour le pourcentage de germination en condition de contrainte hydrique. Cette supériorité phénotypique se traduit génétiquement par l'existence des gènes différents chez les parents et l'accumulation des allèles favorables des deux parents chez ces lignées. La corrélation négative entre le pourcentage de germination (PSG) et les temps de référence de germination dans toutes les conditions indique que les plantes qui ont germé rapidement avaient un pourcentage de germination élevé, ce qui confirme les résultats des travaux de Al-Chaarani et al. (2005) (Article 1, Figure 1-page 54). Ainsi la corrélation positive entre le PSG et la teneur en huile des graines dans toutes les conditions de cultures montre l'importance du rôle des réserves lipidiques pour la germination.

L'analyse de variance effectuée sur les 78 lignées recombinantes (LIRs) cultivées en serre et sur les 100 LIRs cultivées au champ révèle un effet significatif du traitement hydrique pour les teneurs en acides stéarique, oléique et palmitique. La différence entre les lignées recombinantes est hautement significative pour tous les caractères étudiés. On note aussi des interactions « génotype- traitement » hydrique significatives en serre, ce qui indique une réponse différente des génotypes à la sécheresse (Article 2, Tableau 1-page 60). Les teneurs

en acides oléique et linoléique en réponse au stress hydrique diffèrent sensiblement entre les deux parents cultivés en serre. Ceci suggère que les lignées parentales présentent des gènes différents pour ces caractères à la base de phénomènes de transgressions observés chez certaines LIRs. Nous avons comparé la moyenne des deux parents avec celle des lignées et nous avons noté qu'il n'existe aucune différence significative quel que soit le caractère étudié sauf pour la teneur en acide palmitique au champ en condition irriguée. Ce résultat suggère que les lignées recombinantes sont représentatives de l'ensemble des recombinaisons possibles à partir du croisement PAC2 × RHA-266. La différence entre la moyenne de 10% des lignées recombinantes sélectionnées et la moyenne de leurs parents est significative pour la plupart des caractères de qualité de l'huile. Ce phénomène, considéré comme le gain génétique, pourrait être dû à la nature polygénique des caractères de qualité de l'huile et à l'accumulation des allèles favorables chez certaines lignées recombinantes (Article 2, Tableau 2-page 61).

L'analyse de variance effectuée sur les 78 lignées recombinantes (LIRs) cultivées en serre relève un effet significatif du traitement hydrique sur la teneur en protéines et le poids de 1000 graines (Article 3, Tableau 1-page 90). Contrairement à la situation en serre, la différence entre les deux traitements hydriques (irrigué et non-irrigué) au champ est significative seulement pour le poids des amandes et coques. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la contrainte hydrique au champ a été modérée et imposée à un stade plus tardif de développement (post-floraison comparativement à préfloraison pour la situation en serre). La différence entre les lignées recombinantes est significative pour tous les caractères étudiés ainsi que l'interaction « génotype-traitement hydrique ». Nous avons noté que la différence entre les deux parents est significative pour le poids de 1000 graines en condition de stress hydrique en serre. Par contre, au champ il n'existe pas de différences significatives entre les deux lignées parentales pour tous les caractères étudiés, alors que des différences significatives sont observées entre les lignées recombinantes (Article 3, Tableau 1 et 2-page 90-91). Nous pouvons formuler l'hypothèse que les allèles contrôlant ces caractères sont répartis chez les deux parents. Une telle ségrégation transgressive a été déjà observée pour des caractères d'intérêt agronomique chez le tournesol (Rachid Al-Chaarani et al. 2004a ; Mokrani et al. 2002, Poormohammad Kiani et al. 2007)). Un gain génétique significatif a été observé en comparant la moyenne des 10% des lignées recombinantes sélectionnées et la moyenne de leurs parents pour tous les caractères étudiés en serre et au champ sauf pour la

densité des graines en condition de stress hydrique. Ce phénomène se traduit génétiquement par le regroupement d'allèles à effets positifs des deux parents chez ces lignées sélectionnées (Article 3, Tableau 2-page 91).

4.2.2. QTLs associés aux paramètres de germination et de qualité de la graine

Pour l'ensemble des caractères de germination étudiés, le pourcentage de la variance phénotypique expliquée par chaque QTL se situe entre 5% et 29% (Article 1, Tableau 3-page 52). Le groupe de liaison 11 était le plus important pour les temps de référence de la germination avec sept QTLs pour TSG, T50%G et TMG dans les deux conditions hydriques. Tous les allèles favorables pour ces caractères viennent de RHA266 excepté pour le QTL « *2.TMG.11.1* ». Plusieurs co-localisations des QTLs des temps de référence de la germination ont été observées. Les co-localisations sont confirmées également par des corrélations positives hautement significatives entre les temps de référence de la germination (Article 1, Figure 2-page 55). Bettéy et al. (2000) ont également détecté des co-localisations de QTLs pour les temps de référence de la germination chez *Brassica oleracea*.

Sur le groupe de liaison 4, des QTLs non spécifiques (*1.PSG.4.1* et *2.PSG.4.1*) ont été détectés avec des valeurs de R^2 de 9% et 17% ; les allèles favorables viennent du parent PAC2. Cette région pourrait être importante pour des programmes d'amélioration du tournesol, en particulier celle liée au marqueur SSR « *ORS671-1* » qui contrôle le PSG dans les deux conditions (contrainte hydrique et témoin). Nous avons également détecté un marqueur « *E37M61_6* » lié au PSG qui a été reporté pour d'autres paramètres de développement des plantules par Al-Chaarani et al. (2005). Des régions chromosomiques situées sur le groupe de liaison 17 s'avèrent intéressantes pour la germination sous contrainte hydrique, avec trois QTLs contrôlant le PSG. Le QTL le plus important (*2.PSG.17.3*) est lié au marqueur SSR « *ORS677* » avec un pourcentage d'explication de la variation phénotypique (R^2) de 24%.

A notre connaissance, il y a seulement une étude de QTL sur la germination du tournesol dans la littérature; celle-ci a mis en évidence 4 QTLs pour le PSG (Al-chaarani et al. 2005). Nos résultats apportent de nouveaux marqueurs pour la sélection puisque parmi les 10 QTLs détectés pour le PSG, 6 d'entre eux sont associés à des marqueurs SSR (*ORS229*, *HA3938*, *ORS671-1*, *SSL30*, *ORS297* et *ORS677*). L'identification de QTLs non spécifiques à une condition hydrique pour des paramètres de germination indique que la sélection par marqueur

peut être utilisée pour le développement de génotypes présentant une germination améliorée dans des conditions normales et sèches.

Pour les caractères de qualité de l'huile, le pourcentage de la variance phénotypique expliquée par chaque QTL se situe entre 5% et 31% (Article 2, Tableau 4, 5 et 6-page 63-66). Dans de nombreux cas, une même zone chromosomique s'est avérée être associée à plusieurs caractères. Par exemple, des QTLs co-localisés ont été détectés sur le groupe de liaison 3 pour les acides oléiques et linoléiques dans toutes les conditions (irriguée et non irriguée) en serre. La région chromosomique la plus importante pour la teneur en huile se situe sur le groupe de liaison 16, où 3 QTLs ont été détectés pour ce caractère, dans la condition de contrainte hydrique et 2 QTL en condition irriguée en serre et au champ. Nous avons détecté deux QTLs pour la teneur en huile sur le groupe de liaison 1 et 16 qui sont liés aux marqueurs SSR « *ORS959* » et « *ORS407* ». Ces marqueurs ont également été reportés par Tang et al. (2006) comme étant associés à des QTLs contrôlant la teneur en huile chez le tournesol. Le gène « *Es3* » situé sur le groupe de liaison 8 chez le tournesol, est lié au marqueur SSR « *ORS243* » (Pérez-Vich et al. 2006). Dans notre étude, ce marqueur SSR (*ORS243*) est lié avec un QTL contrôlant la teneur en acide palmitique (*4.PA.8.2*) en condition de stress hydrique au champ (Article 2, Tableau 5 page 65). Le gène « *Es3* » détermine un phénotype très élevé d'acide stéarique chez le tournesol avec des effets pléiotropiques sur les autres acides gras (Pérez-Vich et al. 2006).

De nombreux QTLs contrôlant les teneurs en acide oléique (OA) et en acide linoléique (LA) sont co-localisées sur 5 groupes de liaison (3, 4, 7, 8, et 15). Ces co-localisations confirment au niveau génétique les corrélations phénotypiques observées entre OA et LA. Cette base génétique commune pourrait être à relier à l'effet d'un gène spécifique « $\Delta 12$ -desaturase », qui convertit l'acide oléique en acide linoléique dans les graines et modifie ainsi la composition en acides gras (Garcés et al. 1989; Heppard et al. 1996). Un de ces QTLs co-localisées (OA et LA) sur le groupe de liaison 4, est associé au marqueur *ORS337*, qui a été également présenté par Tang et al. (2006) pour la teneur en huile.

En ce qui concerne d'autres caractères de qualité de la graine, comme la teneur en protéines (P%), le poids des graines (TGW), le poids des coques et des amandes et la densité des graines, le pourcentage de la variance phénotypique (R^2) expliquée par chaque QTL se situe entre 3% et 28% (Article 3, Tableau 3 et 4-page 92 et 93). Dans de nombreux cas, un QTL

s'est avéré être associé à plusieurs caractères dans les différentes conditions (champ et serre; bien irriguée et stressé). Par exemple, sur le groupe de liaison 17 le marqueur « *E41M50_10* » est associé à %P et à TGW, suggérant l'existence d'une base génétique commune pour ces caractères de qualité de la graine. Une co-localisation de QTL spécifique (*1. %P.17.1* et *3. %P.17.1*) a été détectée en condition bien irriguée au champ et en serre pour la teneur en protéines sur le groupe de liaison 17. Également, une co-localisation de QTLs (*2.%P.13.1* et *4.%P.13.1*) a été détectée dans les conditions de stress hydrique dans les deux environnements expérimentaux (serre et champ) pour la teneur en protéines. Cette région spécifique se situe sur le groupe de liaison 13. Les allèles favorables pour tous les QTLs dans cette région viennent du parent PAC2. Nous confirmons la capacité de cette lignée parentale pour l'amélioration de la teneur en protéines dans des conditions de contrainte hydrique.

Plusieurs QTLs spécifiques pour le %P ont été localisés sur différents groupes de liaison; mais le groupe de liaison 14 présente une région chromosomique d'intérêt pour ce caractère puisqu'un des 5 QTLs détectés sur ce groupe de liaison contrôle la teneur en protéines dans les différentes conditions étudiées (Article 3, Figure 1-page 97). Dix QTLs pour le poids de 1000 graines (TGW) et le poids de 1000 coques (THW) ont été détectés sur le groupe de liaison 17. Un des QTLs détectés sur ce groupe de liaison (*1.TGW.17.4*) est lié au marqueur SSR « *ORS677* », également rapporté par Tang et al. (2006) pour le poids du péricarpe.

Notre recherche est la première étude sur l'identification de QTL pour la densité de la graine (SD) chez le tournesol. Nous avons détecté 8 marqueurs SSR (*SSL66_2*, *ORS333*, *HA3582*, *HA3683*, *ORS31_3*, *HA3039*, *ORS899* et *SSL22_3*) associés à ce caractère. Sur le groupe de liaison 10, le marqueur SSR « *ORS899* » lié à un QTL de densité de la graine en condition irriguée, a été également rapporté pour des paramètres hydriques de tolérance à la sécheresse par Poormohammad Kiani et al. (2007). Un autre QTL pour la densité de la graine « *4.SD.12.1* » en condition de stress hydrique au champ a également été identifié. Ce QTL est co-localisé avec un QTL pour l'ajustement osmotique (Poormohammad Kiani et al. 2007). Cette co-localisation suggère un contrôle génétique commun pour des critères de tolérance à la sécheresse et des critères de productivité (remplissage des graines).

Ces travaux de l'analyse de QTL nous ont permis d'étudier les bases génétiques de caractères de qualité des graines chez le tournesol. Nous pouvons que les QTLs stables soient pris en compte dans les programmes d'amélioration génétique de la qualité du tournesol. Les QTL

spécifiques pourraient être utiles pour l'amélioration de la qualité chez cette espèce dans des environnements fortement contraints par la ressource en eau.

4.2.3. Comparaison des QTLs des paramètres de germination avec ceux associés à la qualité des graines

Cette partie vise à comparer la position des QTLs identifiés dans les trois articles présentés dans ce chapitre de thèse. Les résultats montrent que plusieurs QTLs se trouvent dans la même région chromosomique. Deux QTLs contrôlant les temps de référence de germination (*1.TM.G.10.2*, *1.TSG.14.2*) (Article 1) sont co-localisées avec des QTLs de teneur en huile des graines (*1.OC.14.3*, *4.OC.10.1*) (Article 2). Ces QTLs communs confirment la corrélation phénotypique observée entre la teneur en huile des graines et la vitesse de germination. De plus, les deux marqueurs SSR associés avec le pourcentage de germination (*SSL30* et *ORS297*) (Article 1) sont également liés à des QTLs pour les teneurs en acides palmitique et linoléique respectivement (Article 2).

Nous avons également détecté une co-localisation de QTLs pour la teneur en protéines des graines (*1.%P.4.1*) (Article 3) et le pourcentage de germination (*1.PSG.4.1*) (Article 1). Ces QTLs sont liés au marqueur SSR (*ORS671_I*). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que durant le développement de l'akène, les protéines accumulées constituent une source d'azote, nécessaire à la germination du futur embryon. Cette région chromosomique a probablement un effet pléiotropique sur le pourcentage de protéines et la germination.

De plus nous avons trouvé quatre régions chromosomiques sur des groupes de liaison 1, 8, 10 et 16, où des QTLs contrôlant la teneur en protéines (Article 3) sont co-localisés avec des QTLs de teneur en huile (Article 2). Ces paires de QTL représentent probablement des gènes impliqués dans la synthèse des protéines avec un effet indirect sur la teneur en huile ou des gènes contrôlant la production de substrats impliquées dans la biosynthèse des lipides et protéines de réserves de la graine. De telles co-localisations (QTLs contrôlant les teneurs en huile et en protéines) ont également été observées chez le colza (Gül et al. 2003).

En conclusion, nous avons étudié les bases génétiques de corrélations phénotypiques observées entre différents caractères par l'analyse de co-localisations de QTLs. Cette étude nous a permis d'identifier des QTLs constitutifs (communs aux différents environnements) et

adaptatifs (spécifiques aux différents environnements) pour un grand nombre de caractères de qualité de la graine chez le tournesol. Les marqueurs SSRs L'identifiés dans les des régions génomiques liées aux caractères de qualité de la graine chez les lignées de tournesol soumises à une contrainte hydrique, peuvent être utiliser dans des programmes de sélection pour l'amélioration de la qualité du tournesol en conditions sèches.

**EVALUATION DE L'EFFET DE MUTATIONS
AUX RAYONS GAMMA SUR LA QUALITE DES
GRAINES DU TOURNESOL (*HELIANTHUS
ANNUUS L.*) EN CONDITION DE STRESS
HYDRIQUE**

5. Evaluation de l'effet de mutations aux rayons gamma sur la qualité des graines du tournesol (*Helianthus annuus* L.) en condition de stress hydrique

5.1. Introduction

L'utilisation de la radiation ionisante, telle que des rayons X, des rayons gamma, des neutrons et des agents mutagènes chimiques pour induire des variations génétiques est bien établie et des mutants induits ont souvent été employés pour l'amélioration de caractères agronomiques. Chez le tournesol, des rayons gamma ont été utilisés pour induire une variabilité génétique pour différents caractères morphologiques (Nabipour et al. 2004), d'organogénèse (Al-Chaarani et al. 2004a), et de germination (Alejo-James et al. 2004). Des mutants « riches en acide palmitique » (environ 30%) ont été obtenues par irradiation aux rayons X de génotypes standards de tournesol (génotype CAS-5) (Osario et al. 1995) et oléique (génotype CAS-12) (Fernandez-Martinez et al. 1997). Trois gènes sont responsables du caractère « riche en acide palmitique » (Pérez-Vich et al. 1998). Ce phénotype serait dû à un effet combiné de l'activité de deux enzymes intervenant dans la synthèse des acides gras (activité faible de la β -keto-acyl protéine synthase II et une haute activité thioestérase sur le palmitoyl-ACP (C16:0-ACP) (Garcés et al. 2000). Des mutants contenant des teneurs en acide stéarique six fois supérieures aux teneurs des variétés classiques ont été développés (Osario et al. 1995). Ces mutants ont été obtenus par traitement à l'éthylméthane sulfonate de la lignée RDF-1-532. Le croisement du mutant « hautement stéarique » avec des variétés oléiques a donné naissance à une autre catégorie de mutants (CAS-3), (Pérez-Vich et al. 2000b) dont l'huile possède une forte stabilité oxydative due à la présence d'acide oléique ainsi qu'une haute plasticité grâce à l'acide stéarique. Plus récemment, un mutant à très haute teneur en acide stéarique (supérieur à 35%) a été isolé (Fernandez-Moya et al. 2002).

L'identification de marqueurs liés aux caractères d'intérêts dans un groupe de génotypes par l'étude de l'association entre le marqueur et le caractère par analyse de la variance ou régressions multiples offre des perspectives intéressantes pour la sélection assistée par marqueurs. Par exemple, Virk et al. (1996) ont rapporté l'association entre des marqueurs de RAPD et des caractères agronomiques chez le riz. Vijayan et al. (2006) ont identifié plusieurs

marqueurs d'ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) liés aux caractères associés à la productivité chez le mûrier. Des marqueurs d'AFLP associés aux caractères agronomiques ont été également identifiés chez le blé par Roy et al. (2006).

Les objectifs de la présente étude sont d'évaluer, au sein d'une population de mutants (lignées M6), la variabilité génétique de caractères de germination et de qualité de la graine dans des conditions hydriques contrastées (avec et sans contrainte hydrique), et d'identifier les marqueurs moléculaires associés aux caractères étudiés. Les expérimentations sont conduites en serre et au champ pour l'évaluation des paramètres de qualités de la graine, et en conditions contrôlées sur milieu de culture pour la détermination des paramètres de germination. Ces résultats ont fait l'objet des deux articles suivants:

4-Ebrahimi, A., Maury, P., Grieu, P., Sarrafi, A. 2008. Genetic variability and evaluation of gamma ray mutation in sunflower germination under water- stress. Plant Breeding,(soumis).

5-Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Shariati, F., Grieu, P., Sarrafi, A. 2008. Genetic improvement of oil quality in sunflower mutants under water stressed conditions. *In proc.* 17th International Sunflower Conference. **2**: 509-512.

Genetic variability of germination parameters in sunflower mutants under water-stressed conditions

A. Ebrahimi^{1,2}, P. Maury^{2,3}, P. Grieu^{2,3*} and A.Sarrafi^{1*}

¹INP-ENSAT, IFR 40, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP-SP2), F-31326 Castanet Tolosan, France

² Université de Toulouse ;INPT ;UMR AGIR, F-31326 Castanet Tolosan, France

³ ENSAT-INP, F-31326 Castanet Tolosan, France

* Ph.D-supervisors

Corresponding author: Professor Ahmad Sarrafi

Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), IFR 40, INP-ENSAT, 18

Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France

e-mail : sarrafi@ensat.fr

Tel: + 33 5 62193580

Fax:+33562193580

Abstract

The objective of the present research was to study 30 mutants, induced by gamma irradiation among a population of M6 sunflower mutant lines and to identify molecular markers associated with different seed germination traits. The experiments were performed under control and water-stressed conditions using randomized blocks design with three replications. The studied traits consisted of critical times and percentage of seed germination (PSG). Water treatment present significant effect for all the traits. Some mutant lines were significantly different for most of germination parameters when compared with the original line (AS613) . High negative significant correlation was observed between PSG and critical times of germination. Mutant line « M6-39 -2 -1 » is significantly better than the original line for the studied traits under water-stressed condition. Multiple regression analyses show that some AFLP markers are associated with several traits. The most important AFLP markers were “*E37M62-5*» and « *E33M60-6* » which have not interaction with water stress . Several markers are associated with seed germination parameters in both conditions. The markers which are associated with different traits could be used for marker-assisted selection.

Key words: water stress - critical times of germination- AFLP markers- mutant- sunflower

Seed germination and early seedling growth are the most sensitive stages to environmental stresses (Cook 1979; Jones 1986). Drought stress is one of the most severe limitations of seed germination and crop growth in semi-arid and arid regions of the world as it plays a vital role in plant metabolism at all growth stages. However, depending upon plant species, germination and seedling development could be critical for water stress. High genetic variability for germination parameters was observed in recombinant inbred lines (RILs) in sunflower (Al-Charrani et al. 2005).

One way to create genetic variability in cultivated sunflower is to induce mutations by irradiation with gamma rays or chemical mutagens. Seed treatment with gamma irradiation has been extensively used to increase variability for several characteristics, such as days to flowering, seed weight, seed coat color, morphological traits and oil content in cultivated sunflower (Gupta, 1976; Robles and Lopez, 1977; Vranceanu and Stoenescu, 1982; Giriraj *et al.*, 1990; Jambhulkar and Joshua, 1999; Encheva et al. 2003; Nabipour et al. 2004). Mutagenesis has been also successfully used for developing variation in the fatty acid profile of sunflower (Fernández-Martínez et al., 1997; Ivanov, 1988; Osorio et al., 1995; Fernández-Moya et al. 2002).

Germination and emergence characteristics are complex traits, likely to be controlled by a number of genes, and therefore require quantitative trait loci (QTL) analysis. Identification of markers associated with important quantitative traits in a group of genotypes through multiple regression analysis offers an alternative means and has been adopted in several plant species. As an example, Vijayan et al. (2006) identified several ISSR markers associated with yield traits in mulberry and AFLP markers associated with agronomic traits in 55 bread wheat genotypes were recognized by Roy et al. (2006). Al-Chaarani et al. (2005) detected four QTLs for germination percentage and two QTLs for time of 50% germination in sunflower in non-drought condition. In water stress condition, one QTL was obtained for mean germination time in *Brasica oleracea* (Bettey et al. 2000). Moreover, in recent years molecular markers have been developed for some of the traits, for example for high stearic and high oleic acid contents (Pérez-Vich *et al.*, 2002), or high beta- and gamma-tocopherol contents (Vera-Ruiz *et al.* 2006; García-Moreno *et al.*, 2006). The use of these markers can contribute to improve breeding efficiency.

As far as we knew genetic analyses for drought stress on seed germination traits in sunflower is not reported in the literature. The aim of this work was to study the effect of mutagenesis in seed germination and to identify AFLP markers associated with germination parameters in sunflower mutant lines under water-stressed conditions.

Materials and methods

Plant material and experimental conditions

The inbred line “AS613” was developed from a cross between ENSAT-125 and ENSAT-704 by a single seed descent (SSD) programme, in our laboratory. This line was selected by Sarrafi et al. (2000) for its high organogenesis response. 1500 seed of “AS613” were exposed to gamma rays at the Atomic Energy Center (Cadarache, France) with a dose of 75 Grays. The seeds were grown in the field and M1 plants were produced. M6 generation was advance by self-pollination in SSD programme started with selected M2 plants . Through 2000 M6 , 30 lines showing morphological differences compared with “AS613” in our experimental conditions were selected for this research work . Our experiments were performed in control and water-stressed conditions. Sterile germination medium containing 0.3% w/v Phytigel was prepared for control and water stress treatments. The germination medium for the water stress treatment included also 0.28% w/v polyethylene glycol (PEG 6000), corresponding to -1.3 MPa of water potential (Lenzi et al. 1995, Foolad et al. 2003). The seeds were surface-sterilized with 0.5% calcium hypochloride and washed three times in sterile, distilled water and briefly blotted. The seeds were then transferred to Petri dishes (95 mm diameter) containing the special medium. Each Petri dish contained 20 seeds (one replication). Petri dishes were placed in a factorial design in incubators maintained in dark where the temperature was 25°C for day (16 h) and 20°C for night (8h). The experiment consisted of a randomized block design with three replications.

Traits measurements

The number of germinated seeds was determined for each treatment per genotype per replication two times a day until the time that the percentage of germination was stable in five successive observations. The time to starting germination (TSG) was determined when the protrusion of the radicle was observed for at least one seed in the Petri dish. The time to maximum germination (TMG) was determined when for the first time the percentage of seed germination (PSG) was stable. The time to 50% germination (T50%G) corresponds to 50% of total seed germination in the Petri dish. Seed oil content (OC) determined by Nuclear Magnetic Resonance and 1000 grain weight (1000GW) were measured per genotype per replication.

Genomic DNA isolation and AFLP genotyping

Genomic DNA of AS613 and mutant lines were isolated from two-week old seedlings according to the method of extraction and purification presented by Fulton et al. (1995). Different *MseI* / *EcoRI* primer combinations were used for AFLP genotyping (Table 1). The AFLP procedure was conducted as described by Al-Chaarani et al. (2004). AFLP bands were scored from the gel as presence (1) or absence (0).

Statistical analysis

The variability among the mutants for the quantitative traits was tested by ANOVA using the SAS PROC GLM (SAS Institute Inc, NC, USA). Phenotypic correlations between the quantitative traits were determined using SAS PROC CORR.

The association between AFLP markers and quantitative traits was obtained through stepwise multiple regression analysis, where each quantitative trait was considered as a dependent variable while the AFLP marker was treated as an independent variable (Vijayan et al. 2006).

Results

Analysis of variance of the original and mutant lines showed highly significant variation between genotypes for all the germination parameters studied except for T50%G (Table 2). The effect of water stress treatment was highly significant for all the critical time of germination as well as for percentage of seed germination. « Mutant × stress treatment » was also significant for all the traits except for T50%G, indicating a difference among mutants in the responses of germination to drought.

Some mutants presented interesting values for more than one trait (for example M6-284 -1) and some others just for one trait (Table 3). Some mutants presented significant differences with the original line AS613 for some of the studied traits. Genetic gain (GG) calculated as the difference between the best mutant and original line was significant for TMG and PSG under water stress and T50%G under control condition (Table 3).

Significant negative correlations are also observed between the critical times of germination (TSG, T50%G and TMG) and PSG in water-stressed condition (Table 4). Negative correlation between 1000 GW and the PSG is observed in both conditions which becomes significant in water-stressed condition. High negative significant correlation is also observed between OC and TMG in water-strassed condition. In total 40 AFLP markers associated with the germination traits were identified in this study. Some markers are associated with different traits (for example *E33M62-10* is linked with *TSG* and *T50%G*) and some others are common across control and water stressed conditions, such as *E37M62-5* which is linked to PSG, TSG

and TMG. There are also several specific markers for each water treatment as well as for each trait.

Discussion

Phenotypic variation between genotypes

Water stress affected all of germination parameters significantly. In addition, there are differences between the mutants in term of their response to drought, which is in agreement with the results of Turhan and Baser (2004) and Lenzi et al. (1995) in sunflower. Mutant-water stress interaction is significant for all the trait except for T50%G, suggesting that response by a genotype in relation to other genotypes varies between the two germination media. Significant genetic variation observed among mutant lines for the studied traits (except T50%G) revealed the efficiency of gamma-irradiation for inducing genetic variation in sunflower for seed germination parameters. Two mutant lines (M6-284-1 and M6-39 -2 -1) present advantages over AS613 for TMG and PGS respectively under water stress. These mutant lines could be used in breeding programmers to improve the ability of seed germination under water stress conditions. Mutant line “M6-826-2” presented interesting value for T50G under control when compared with the original line. This mutant line also presented high values for oleic and stearic acid content in our previous work (Ebrahimi et al. 2008 c).

Phenotypic correlations are positive and significant between times to starting and 50% germination (TSG and T50%G) under control, such as results of Foolad et al. (1998) in tomato under salt stress. The correlations among the critical times of germination indicated conceivably that similar physiological mechanisms control the important times of germination (TSG and T50%G) in sunflower. The negative correlations between PSG with critical times of germination (TSG, T50%G and TMG) are obtained under both conditions, which confirm the results of Ebrahimi et al. (2008b) in sunflower recombinant inbred lines. Negative significant correlation was observed between 1000GW with PSG under drought, which is also reported by Singh et al. (1978) in soybean and Torres et al. (1991) in sunflower suggesting the important of 1000GW in drought stress germination. Negative genetic correlation between percentage of seed germination and time of 50% germination in sunflower inbreeds lines is also reported by Al-Charrani et al. (2005).

Marker analyses

Our results show that some AFLP markers are associated with several traits and some others are specific for only one trait or a given water treatment (Table 5). The phenotypic variance explained by each marker (R^2) is important, ranging from 12.3 to 32.3%. Significant genetic variation observed among mutant lines for the studied traits revealed the efficiency of gamma-irradiation for inducing genetic variation in sunflower for seed germination traits.

Three AFLP markers (*E33M62-10*, *E31M62-10* and *E38M62-2*) are detected which are common for the critical times of germination (TSG and T50%G) in control conditions. These markers are non-specific for critical time of germination (TSG and T50%). One of these markers (*E31M62-10*) is also linked to PSG under control condition. The latter result suggested probably pleiotropic effects of *E31M62-10* marker in germination and its critical times which is in agreement with Ebrahimi et al. (2008b) where several QTLs of PSG and critical times to germination in sunflower inbred line were also co-located. The absence of “*E31M62-10* » marker was shown to have the best value for PSG trait. Bettey et al. (2000) also detected the overlapping of critical times of germination in *Brassica oleracea*. “*E33M50-10*” marker is associated with both TSG and TMS under control condition. The presence of « *E33M50-10* » delay seed germination in sunflower. AFLP marker ‘*E37M48-8*’ for T50%G under control condition in this study which was also reported for stearic, oleic and linoleic acids by Ebrahimi et al (2008c).

A non-specific marker (*E33M49-7*) was identified under water stressed condition for critical time of germination. “*E33M49-7*” marker is associated with TSG and T50%G. The absence of this marker increased the critical times of germination under water-stressed condition.

“*E31M50-13* » marker is linked to TSG and PSG and explained 20% of germination variability under drought condition. The presence of the later marker has an important effect in seed germination of sunflower. We also detected two markers (*E37M62-5* and *E33M60-6*) which have not interaction with water treatments for PSG and the critical times of germination. These later markers are associated with PSG under water stress and are linked to TSG and T50%G under control condition. These markers were reported also for palmitic acid content (Ebrahimi et al. 2008a). Thus “*E37M62-5* and *E33M60-6* » could be used in marker assisted selection programmes in sunflower quality and germination traits. Several specific markers were detected for each trait under both conditions as example “*E33M59-7*» and « *E33M50-3* » presented high value of phenotypic variance (21%) for TMG under water stressed condition. Markers associated with different traits in control and water-stressed conditions could be used for marker-assisted selection in both environments.

References

- Al-Chaarani, G. R., L. Gentzbittel, M. Wedzony, and A. Sarrafi, 2005: Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Science* **169**, 221-227.
- Al-Charrani, G., L. Gentzbittel, G. Barrault, S. Lenoble, and A. Sarrafi, 2004: The effect of gamma rays and genotypes on sunflower organogenesis traits. *J. Genet. Breed.* **58**, 73-78.
- Betty, M., W. E. Finch-savage, G. J. King, and J. R. Lynn, 2000: Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in *Brassica oleracea*. *New Phytol.* **148**, 277-286.
- Cook, R. E., 1979: Patterns of juvenile morbidity and recruitment in plants. In: O. T. Solbrig, S. Jain, G. B. Johnson, and P. H. Raven (eds.), *Topics in Plant Population Biology*, 207-301. Columbia University Press, Los Angeles.
- Ebrahimi, A., P. Maury, M. Berger, S. Poormohammad Kiani, A. Nabipour, F. Shariati, P. Grieu, and A. Sarrafi, 2008a: QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. *Genome* **51**, 599-615.
- Ebrahimi, A., P. Maury, P. Grieu, and A. Sarrafi, 2008b: Genetic variability and QTL mapping for seed germination parameters under drought stress in sunflower. *Plant Breed.* Submitted.
- Ebrahimi, A., P. Maury, M. Berger, F. Shariati, P. Grieu, and A. Sarrafi, 2008c: Genetic improvement of oil quality in sunflower mutants under water stressed conditions. The 17th International Sunflower Conference, Cordoba, Spain, L. Velasco (ed) **2**, 509-512.
- Encheva, J., M. Christov, N. Nenov, F. Tsvetkova, P. Ivanov, P. Shindrova, and V. Encheva, 2003: Developing genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by combined use of hybridization with gamma radiation or ultrasound. *Helia* **26**, 99-108.
- Fernández-Martínez, J. M., J. Osorio, M. Mancha, and R. Garcés, 1997: Isolation of high palmitic mutants on high oleic background. *Euphytica* **97**, 113-116.
- Fernández-Moya, V., E. Martínez-Force, and R. Garcés, 2002: Temperature effect on a high stearic acid sunflower mutant. *Phytochem.* **59**, 33-38.
- Foolad, M. R., F. Q. Chen, and G. Y. Lin, 1998: RFLP mapping of QTLs conferring salt tolerance during germination in an interspecific cross of tomato. *Theor. Appl. Genet.* **97**, 1133-1144.
- Foolad, M. R., L. P. Zhang, and P. Subbiah, 2003: Genetics of drought tolerance during seed germination in tomato: inheritance and QTL mapping. *Genome* **46**, 536-545.

- Fulton, T.M., J. Chungwognse, and S. D. Tanksley. 1995: Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and herbaceous plants. *Plant Mol. Biol.* **13**, 207-209.
- García-Moreno, M. J., E. M. Vera-Ruiz, J. M. Fernández-Martínez, L. Velasco, and B. Pérez-Vich, 2006: Genetic and molecular analysis of high gamma-tocopherol content in sunflower. *Crop Sci.* **46**, 2015-2021.
- Giriraj, K., S. R. Hiremath, and A. Seetharam, 1990: Induced variability for flowering, seed weight and oil content in parental lines of sunflower hybrid BSH-1. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* **50**, 1-7.
- Gupta, A., 1976: Differential effects of irradiation on ornamental varieties of *Helianthus annuus* L. with special reference to their cytological behavior. *Agron. Lusit.* **37**, 189-205.
- Ivanov, P., D. Petakov, V. Nikolova, and E. Petchev, 1988: Sunflower breeding for high palmitic acid content in the oil. The 12th Int. Sunflower Conf., Novi Sad, Yugoslavia. Int. Sunflower Assoc., Toowoomba, Australia. 463-465.
- Jambhulkar, S. J., and D. C. Joshua, 1999: Induction of plant injury, chimera, chlorophyll and morphological mutations in sunflower using gamma rays. *Helia* **22**, 63-73.
- Jones, R. A., 1986: High salt-tolerance potential in *Lycopersicon* species during germination. *Euphytica* **35**, 576-582.
- Kearsey, M. J., 1998: The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany* **49**, 1619-1623.
- Lenzi, A., M. Fambrini, S. Barotti, C. Pugliesi, and P. Vernieri, 1995: Seed germination and seedling growth in a wilty mutant of sunflower (*Helianthus annuus* L.): effect of abscisic acid and osmotic potential. *Environ. Exp. Bot.* **35**, 427-434.
- Osorio, J., J. M. Fernández-Martínez, M. Mancha, and R. Garcés, 1995: Mutant sunflower with high concentration in saturated fatty acid in the oil. *Crop Sci.* **35**, 739-742.
- Pérez-Vich, B., J. M. Fernández-Martínez, M. Grondona, S. J. Knapp, and S. T. Berry, 2002: Stearoyl-ACP and oleoyl-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying stearic and oleic acid mutant phenotypes in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 338-349.
- Robles-S, R., and E. Lopez-S, 1977: Efecto de las irradiaciones gamma 60Co de 10 a 25 krads a la semilla de girasol (*Helianthus annuus* L.) variedad Tecmon-1. Monterrey, Invest. Inst. Technol. Estud. Super., Div. Cienc. Agropec. Maritimas. 58-60.
- Sarrafi, A., H. Kayyal, G. Rachid Al-Chaarani, F. Cantin, A. S. Chaline, and E. Durielle. 2000: Inheritance of organogenesis parameter in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Genet. Breed.* **54**, 227-231.

- Singh, C. B., M. A. Dalai, and S. P. Singh., 1978: Genetic Analysis of Field Germination in Soybean. *Theor. Appl. Genet.* **52**, 165-169.
- Torres, M. G., S. Frutos, and J. M. Duran, 1991: Sunflower seed deterioration from exposure to UV-C radiation. *Environ. Exp. Bot.* **31**, 201-207.
- Turhan, H., and I. Baser, 2004: In vitro AND In vivo water stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* **27**, 227-236.
- Vera-Ruiz, E. M., L. Velasco, A. J. Leon, J. M. Fernández-Martnez, and B. Pérez-Vich, 2006: Molecular tagging and genetic mapping of the *Thp1* gene controlling beta-tocopherol accumulation in sunflower. *Mol. Breed.* **17**, 291-296.
- Vijayan, K., P. P. Srivatsava, C. V. Nair, A. K. Awasthi, A. Tikader, B. Sreenivasa, and S. R. Urs, 2006: Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant Breed.* **125**, 298-301.
- Vranceanu, A. V., and F. M. Stoenescu, 1982: Achievements and prospects of sunflower genetics, breeding and induced mutation utilization. In: IAEA. Improvement of oil seed and industrial crops by induced mutations. Vienna, International Atomic Energy Agency.
- Nabipour A., B. Yazdi-Samadi, and A. Sarrafi, 2004: Genetic control of some morphological mutant in sunflower. *J. Genet. Breed.* **58**, 157-162.

Table 1

17 AFLP primer combinations and their polymorphic markers used for genotyping M6 mutants and their original line (AS613) of sunflower

Primer combinations	Number of polymorphic markers	Primer combinations	Number of polymorphic markers
E31M50(EAAA×MCAT)	13	E33M48(EAAG×MCAC)	9
E31M62(EAAA×MCTT)	10	E33M59(EAAG×MCTA)	15
E31M48(EAAA×MCAC)	9	E37M50(EACG×MCAT)	27
E33M50(EAAG×MCAT)	16	E37M48(EACG×MCAC)	8
E33M60(EAAG×MCTC)	11	E37M62(EACG×MCTT)	9
E33M61(EAAG×MCTG)	8	E38M62(EACT×MCTT)	8
E33M47(EAAG×MCAA)	13	E40E50(EAGC×MCAT)	9
E33M49(EAAG×MCAG)	15	E40M59(EAGC×MCTA)	9
E33M62(EAAG×MCTT)	10	Total	200

Table 2

Mean squares of analysis of variance for some germination parametrs in sunflower mutants

Source	df	Mean squares			
		TSG	T50%G	TMG	PSG
Stress treatments	1	96,049.80**	280,862.41*	717,826.05***	82,133.47 *
Block	2	1,011.80	4,353.06	91.55	271.81
Stress treatments ×Block	2	155.40	4,909.73	43.65	292.64 ***
Mutants	29	245.79***	6,806.23	1,274.64 ***	565.94***
Stress treatments × Mutants	29	210.66***	6,442.64	1,276.77 ***	420.54 ***
Error	116	70.13	5,686.44	141.57	28.49

TSG; time to starting germination (h), T50%G; time to 50% germination (h), TMG; time to maximum germination (h), PSG; percentage of seed germination. *, **, ***; significant at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels respectively.

Table 3

Seed germination traits and genetic gain (GG) of sunflower mutants under control (C) and stressed (S) conditions.

	TSG		T50%G		TMG		PGS	
	C	S	C	S	C	S	C	S
AS613	18	58	23.8	67.4	42	181	100	70
M6-284 -1	15	58	18.4	70.9	39	162	96.67	66.67
M6-826-2	15	82	11.53	108.5	42	194	98.33	45
M6-143 -2	18	45	20.8	76.4	39	175	100	70
M6-39 -2 -1	18	53	22.8	68.5	42	170	100	78.60
M6-39 -2 -2	18	53	21.0	74.4	39	170	96.66	73.33
GG= best mutant - AS613	-3	-13	-12.27*	1.1	-3	-19*	0	8.60*

TSG; time to starting germination (h). T50%G; time to 50% germination (h). TMG; time to maximum germination (h). PGS; percentage of seed germination.

* and ns: significant at 0.05 level and non significant. GG: Genetic gain calculated as the differences between the best mutant and original line (*AS613*). Values are presented for the original line AS613 and for 5 selected mutants which present the highest values

Table 4

Correlation between some germination parametrs in control (C) and drought stress (S) conditions

	watertreatment	TSG	T50%G	TMG	PSG	1000-GW
T50%G	C	0.46***				
	S	0.08				
TMG	C	0.05	0.09			
	S	0.00	0.03			
PSG	C	-0.15	-0.31**	-0.01		
	S	-0.47***	-0.23*	-0.29**		
1000-GW	C	0.04	-0.09	0.07	-0.06	
	S	0.09	0.12	0.20*	-0.25**	
OC	C	0.00	0.00	0.14	-0.13	-0.04
	S	0.02	-0.03	-0.33**	0.00	-0.05

TSG; time to starting germination (h), T50%G; time to 50% germination (h),
 TMG; time to maximum germination (h), PSG; percentage of seed germination,
 OC; oil content (%), 1000GW; 1000-grains weight (gr)

*, **, ***; significant at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels respectively,

Table 5 : Main markers associated with the seed germination traits in sunflower mutants.

Control					Drought stress				
Trait	marker	probability	R ² %	M1- M2	Trait	marker	probability	R ² %	M1- M2
TSG	<i>E40M59-7</i>	*	15.00%	-2.80	TSG	<i>E33M49-7</i>	***	32.30%	-14.20
	<i>E38M62-2</i>	**	20.90%	-2.87		<i>E31M50-13</i>	*	16.40%	-9.53
	<i>E37M62-5</i>	**	19.10%	2.22		<i>E33M50-15</i>	**	26.20%	-14.27
	<i>E33M47-8</i>	*	16.7%	2.79		<i>E40M50-1</i>	**	19.80%	-49.71
	<i>E37M50-8</i>	*	12.90%	2.09	T50%G	<i>E40M50-5</i>	**	27.90%	-102.95
	<i>E31M62-10</i>	*	14.60%	2.22		<i>E33M49-7</i>	*	13.60%	-50.96
	<i>E33M50-10</i>	*	12.90%	2.09		<i>E33M59-10</i>	**	20.40%	25.54
	<i>E33M62-10</i>	*	14.60%	2.22		<i>E33M50-9</i>	*	12.70%	22.73
T50%G	<i>E37M48-8</i>	*	12.30%	2.12	TMG	<i>E33M59-7</i>	**	21.80%	-28.73
	<i>E33M60-6</i>	**	26.00%	6.01		<i>E33M50-3</i>	**	21.30%	27.03
	<i>E38M62-2</i>	*	15.70%	-2.06		<i>E33M47-10</i>	**	20.40%	25.70
	<i>E37M62--2</i>	*	13.40%	-5.08		<i>E37M62-5</i>	*	12.20%	-20.43
	<i>E31M62-10</i>	*	18.30%	3.63		<i>E33M60-8</i>	*	14.60%	22.90
	<i>E33M62-10</i>	**	18.30%	3.64		<i>E33M60-7</i>	**	20.00%	28.52
	<i>E33M59-4</i>	*	15.00%	-5.21		<i>E40M59-7</i>	*	17.80%	-29.79
	<i>E33M47-5</i>	*	14.00%	6.50	PSG	<i>E33M62-5</i>	*	13.00%	14.88
TMG	<i>E33M50-26</i>	*	14.50%	3.90		<i>E31M62-5</i>	*	13.00%	14.88
	<i>E37M50-18</i>	**	18.30%	4.38		<i>E37M62-5</i>	*	15.00%	-14.21
	<i>E31M48-6</i>	*	12.70%	3.69		<i>E31M50-13</i>	**	20.00%	15.56
	<i>E33M50-1</i>	*	14.50%	4.10		<i>E33M60-11</i>	*	16.80%	-15.17
	<i>E33M50-8</i>	*	14.50%	3.94		<i>E33M60-6</i>	*	14.70%	-15.82
	<i>E33M50-10</i>	**	18.30%	4.38		<i>E40M50-7</i>	*	12.50%	12.82
	<i>E33M49-6</i>	*	15.60%	4.16					
	<i>E38M62-1</i>	*	12.90%	2.60					
PSG	<i>E31M50-10</i>	*	15.00%	3.05					
	<i>E31M62-6</i>	*	14.70%	3.26					
	<i>E31M62-10</i>	**	23.40%	-3.5					
	<i>E33M49-7</i>	*	15.50%	3.00					

TSG; time to starting germination (h). T50%G; time to 50% germination (h). TMG; time to maximum germination (h). PSG; percentage of seed germination. *, **, ***; significant at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels respectively. M1-M2: difference between two marker classes as revealed by analysis of variance of trait by marker genotype

Genetic improvement of oil quality in sunflower mutants under water stressed conditions

A. Ebrahimi^{1,2}, P. Maury^{2,3}, M. Berger⁴, F. Shariati⁵, P. Grieu^{2,3}, A. Sarrafi¹

¹INP-ENSAT, IFR 40, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), F-31326 Castanet Tolosan, France, E-mail: asa.ebrahimi@ensat.fr, sarrafi@ensat.fr

²INP-ENSAT, ³INRA, UMR 1248 AGIR, F-31326 Castanet Tolosan, France,
E-mail: maury@ensat.fr, grieu@ensat.fr

⁴UMR INRA/ESAP 1054 - Laboratoire d'agrophysiologie, Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan, 31076 Toulouse Cedex 03, France, E-mail: monique.berger@purpan.fr

⁵Department of Oilseed Crops Breeding, Seed and Plant Improvement Institute, Mahdasht Ave., Karaj, Iran

ABSTRACT

The objective of the present research was to study 30 mutants, induced by gamma irradiation among a population of M6 sunflower mutant lines and to identify molecular markers associated with different seed quality traits. The experiments were performed in two environments (greenhouse and field) under well-watered and water-stressed conditions. Experiments consisted of three blocks, and each block was split into two main plots (well-watered and water-stressed). The seed quality traits studied were: protein content (PC), oil content (OC), palmitic acid (PA), stearic acid (SA), oleic acid (OA) and linoleic acid (LA). In both environments and both conditions, a large genetic variation was observed between mutant lines and some mutants presented higher values for seed quality traits in comparison to original line. Two mutants M6-862-1NI and M6-826-2 showed the most important values for OC and OA in comparison with the original line AS613 under all conditions. The results revealed the efficiency of gamma-irradiation for inducing genetic variation in sunflower for seed quality traits. Multiple regression analyses showed that some AFLP markers are associated with several traits. The most important were E40M59-5 and E33M49-5 markers, with more than 30% of phenotypic variance for OC and PA under water stressed condition. There were several markers associated with quality traits in both well-watered and water-stressed conditions. Some other markers were specific for only one trait or a given water treatment. The markers which were associated with different traits could be used for marker-assisted selection.

Key words: gamma irradiation – genetic variation - AFLP – oil quality - water stress – sunflower.

INTRODUCTION

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the four major annual world oilseed crops which is cultivated for edible oil. In commonly grown sunflower cultivars, the oil contains a high proportion (about 90%) of unsaturated fatty acids; oleic (C18:1) and linoleic (C18:2) acids. The remaining 10% corresponds to the saturated fatty acids palmitic (C16:0) and stearic (C18:0) acids (Garcés et al. 1989).

Mutagenesis has been successfully used for developing variation in the fatty acid profile of sunflower and mutants with an altered fatty acid content have been developed, such as high oleic acid mutant Pervenets (Soldatov, 1976), mutants 275HP and CAS-5 with high palmitic acid content (Ivanov, 1988; Osorio et al., 1995), CAS-12 with high palmitic and oleic acids (Fernandez-Martinez et al., 1997), mutants CAS-8, CAS-4 and CAS-3 with medium to high stearic acid (Osorio et al., 1995) and CAS-14 with very high stearic acid (Fernández-Moya et al., 2002). Using molecular markers in selecting genotypes with desirable traits through marker-assisted selection has been proved to be effective in plants. Identification of markers associated with important traits in a group of genotypes through multiple regression analysis offers an alternative means and has been adopted in several plant species. As an example, Vijayan et al. (2006) identified several ISSR markers associated with yield traits in mulberry. The aim of this study was to identify the interesting mutants for oil quality and to detect the molecular markers associated with oil quality traits.

MATERIALS AND METHODS

A population of gamma rays mutant lines (M6) coming from AS613 genotype was developed in our laboratory (Sarraf et al. 2000). Among this population, 30 mutants showed morphological differences in comparison with 'AS613', which were used in our experiments.

The quantitative traits were evaluated in two environments: greenhouse under controlled conditions and field. Each experiment was conducted with two conditions: well watered and water stressed. Both experiments consisted of three blocks, and each block was split into two main plots (well- watered and water stressed). Protein content (PC), oil content (OC), palmitic acids (PA), stearic acid (SA), oleic acid (OA) and linoleic acid (LA) were measured by FOSS NIR System 6500 (Foss Analytical, Denmark).

Genomic DNA of AS613 and mutant lines were isolated from two-week old seedlings according to the method of extraction and purification presented by Fulton et al. (1995). Different *MseI* / *EcoRI* primer combinations were used for AFLP genotyping. The AFLP procedure was conducted as described by Al-Chaarani et al. (2004). AFLP bands were scored from the gel as presence (1) or absence (0).

The variability among the mutants for the studied traits was tested through ANOVA. A simple correlation between the quantitative traits was calculated. The association between AFLP markers and quantitative traits was obtained through stepwise multiple regression analysis, where each quantitative trait was considered as a dependent variable while the AFLP marker was treated as an independent variable (Vijayan et al. 2006).

RESULTS

Analysis of variance showed significant variability among mutant lines for all seed quality traits in two environments under well-watered and water-stressed conditions. The effect of water-stress was significant for PC, OC and SA in the greenhouse as well as for SA in the field (data are not presented).

Table 1. Seed quality traits and genetic gain (GG) of sunflower mutants in two experiments: greenhouse (1) and field (2) under well-watered (WW) and water-stressed (WS) conditions.

Mutants	Exp.	PC		OC		PA		SA		OA		LA	
		WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS
AS613	1	19.2	18.6	45.7	45.3	5.7	5.3	3.3	3.3	33.3	38.8	59.6	53.9
	2	22.4	21.4	37.6	38.9	5.5	6.0	5.8	4.2	34.2	29.4	53.2	60.3
M6-826-2	1	24.6	24.1	43.6	47.0	5.0	4.7	4.5	4.6	61.0	72.2	29.9	20.5
	2	23.4	19.7	34.1	41.8	5.0	4.8	8.2	9.4	43.2	48.0	42.4	37.7
M6-133-2	1	24.3	23.1	39.9	43.3	5.4	5.1	3.7	4.2	42.1	46.1	49.6	46.0
	2	27.3	22.1	33.7	33.8	7.2	7.2	5.4	5.5	22.7	21.9	64.8	68.1
M6-375-1	1	21.7	20.0	39.0	39.1	5.1	4.9	3.9	3.8	41.5	41.4	50.1	50.1
	2	24.8	23.7	30.3	35.0	5.3	5.1	5.7	5.4	33.2	37.9	55.0	51.0
M6-862-1NI	1	16.4	16.5	54.8	54.3	6.3	5.9	1.8	1.8	36.5	35.8	61.3	53.4
	2	20.8	18.5	43.3	50.1	5.7	5.2	4.0	3.8	19.9	23.1	55.6	52.6
M6-186-1	1	20.8	18.6	44.2	47.8	6.2	6.8	2.7	2.8	28.5	18.5	62.9	72.4
	2	23.4	16.9	37.3	37.9	7.1	7.5	5.0	5.0	23.4	19.9	64.8	67.5
M6-653	1	21.8	21.8	45.2	45.3	5.1	4.9	3.8	4.3	43.4	44.5	48.5	46.8
	2	24.9	20.4	33.8	36.2	9.5	6.3	3.9	5.1	26.7	30.3	58.3	58.2
M6-641-2	1	20.2	21.8	40.8	43.4	5.3	5.6	3.7	4.0	41.9	36.9	49.6	54.6
	2	20.7	16.4	35.2	38.2	5.8	7.4	3.8	3.2	26.7	17.4	63.6	71.9
GG	1	5.1*	5.5 ^{ns}	9.1*	9.0*	0.6*	1.5*	1.2*	1.3*	27.7*	33.4*	3.3 ^{ns}	18.5*
	2	4.9*	2.3 ^{ns}	5.7*	11.2*	4.0*	1.5*	2.4*	5.2*	9.0*	18.6*	11.6*	11.6*

PC, Protein Content; OC, Oil Content; PA, Palmitic Acid content; SA, Stearic Acid content; OA, Oleic Acid content; LA, Linoleic Acid content

* and ns: significant at 0.05 level and non significant. GG: Genetic gain calculated as the differences between the best mutant and original line (AS613). Values are presented for the original line AS613 and for 7 selected mutants which present the highest values

Negative significant correlation was observed between OC and PC, OA and LA, PA and SA and SA with LA, whereas correlation between SA and OA was positive (data are not presented). Some mutants presented high values for more than one trait (M6-186-1, M6-862-1NI, and M6-826-2) and some others just for one trait (Table 1). Some mutants presented significant differences with the original line AS613 for several traits. Genetic gain (GG) calculated as the difference between the best mutant and original line was significant for all the studied traits except for PC under water-stressed condition in all environments and for LA under well-watered condition in greenhouse (Table 1).

Table 2. Main markers associated with the seed quality traits in sunflower mutants.

Trait	Exp.	Marker	Well-watered			Trait	Exp.	Marker	Water-stressed		
			P	R ² (%)	M1- M2				p	R ² (%)	M1- M2
OC	1	E40M59-5	*	15.2	-5.51	OC	1	E40M59-5	***	35.3	-8
OC	2	E40M59-5	**	24.4	-7.1	OC	2	E40M59-5	*	18.7	-5.74
PC	1	<i>E33M50-17</i>	**	29.8	-2.91	PC	1	<i>E33M50-17</i>	**	21.7	-2.97
PC	1	<i>E37M50-14</i>	*	17.1	-2.2	PC	1	<i>E31M48-4</i>	*	16.7	2.11
PC	2	E40M59-5	*	14.8	3.38	PC	1	E40M59-5	*	13.2	3.72
PA	1	<i>E37M50-14</i>	*	19.41	0.42	PC	1	<i>E37M50-6</i>	**	19.8	-2.57
PA	1	<i>E31M50-1</i>	**	22.2	-0.38	PC	2	E40M59-5	*	17.3	2.96
SA	1	E40M59-5	**	22.8	1.02	PC	2	<i>E31M50-1</i>	*	16.4	1.58
SA	1	<i>E31M50-1</i>	**	23.7	0.54	PA	1	<i>E37M50-14</i>	*	16.2	0.34
SA	2	<i>E37M50-14</i>	**	22.8	-1.41	PA	1	E40M59-5	*	13.7	-0.50
SA	2	<i>E33M50-17</i>	**	23.2	-1.42	PA	2	<i>E37M50-6</i>	*	20.7	-0.27
SA	2	<i>E37M48-8</i>	*	18	-1.54	PA	2	<i>E33M49-5</i>	**	33.2	1
SA	2	<i>E31M50-1</i>	**	23.4	1.16	SA	1	E40M59-5	**	22.5	1.2
OA	1	<i>E37M50-14</i>	**	21.9	-9.52	SA	2	<i>E37M50-14</i>	**	23	-1.47
OA	1	<i>E37M48-8</i>	**	23	-11.64	SA	2	<i>E37M50-6</i>	**	21.3	-1.26
OA	1	<i>E33M50-17</i>	**	22	-9.55	SA	2	<i>E37M48-8</i>	*	18.3	-1.54
LA	1	<i>E37M50-14</i>	**	23	9.75	OA	1	<i>E37M50-6</i>	**	18	-6.37
LA	1	<i>E37M48-8</i>	**	23.6	11.46	OA	1	<i>E37M50-14</i>	*	16.6	-6.75
LA	1	<i>E33M50-17</i>	**	22.9	9.71	OA	2	<i>E37M50-6</i>	**	29.4	-8.43
LA	2	<i>E37M48-8</i>	*	14.2	6.88	OA	1	<i>E33M59-12</i>	**	19.7	6.66
LA	2	<i>E40M59-1</i>	**	24.8	-6.29	OA	2	<i>E37M48-8</i>	**	21.1	-9.9
						LA	1	<i>E37M50-6</i>	**	22.2	7.27
						LA	1	<i>E33M59-12</i>	**	19.9	-6.95
						LA	2	<i>E37M48-8</i>	*	19.7	9.87
						LA	2	<i>E37M50-6</i>	**	30.4	8.84

PC, Protein Content; OC, Oil Content; PA, Palmitic Acid content; SA, Stearic Acid content; OA, Oleic Acid content; LA, Linoleic Acid content . 1; greenhouse, 2; field. M1-M2: difference between two marker classes as revealed by analysis of variance of trait by marker genotype

In total 34 and 31 AFLP markers associated with the quantitative traits were identified in greenhouse and field, respectively (Table 2). More than 61% of the detected markers were identical in two experimental environments. Some markers were associated with different traits (for example, E33M50-17, associated with PC, SA, OA and LA) and some others were common across water treatments such as E40 M59-5 associated with OC under well-watered and water-stressed conditions (Table 2).

The results showed that E40M59-5 and E33M49-5 markers are the most important ones in water-stress conditions with more than 30% of phenotypic variance for OC and PA.

DISCUSSION

Significant genetic variation observed among mutant lines for the studied traits revealed the efficiency of gamma-irradiation for inducing genetic variation in sunflower for seed quality traits. Some mutant lines presented advantages over AS613 for different traits. Two mutant lines M6-862-1NI and M6-826-2

showed important values of OC and OA, respectively, in comparison with the original line AS613 in two environments under both conditions (well-watered and water-stressed). These mutant lines could be used in breeding programmes to improve seed oil content under water stress growth conditions. On the other hand, the mutant line M-862-1NI showed the maximum value for PA only under well-watered condition and a low value under water-stressed condition. This mutant is a sensitive genotype under water stress. The significant negative correlation between PC and OC in our mutant lines was observed also by Mahmood et al. (2006) in *Brassica juncea*.

Our results show that some AFLP markers are associated with several traits and some others are specific for only one trait or a given water treatment (Table 2). The phenotypic variance explained by each marker (R^2) was important, ranging from 13.7 to 35.3%. E40M59-5 marker was associated with OC in two environments under both conditions (well-watered and water-stressed). The latter marker is the most important marker in this study as it is associated with some other traits (PC, PA and SA) in well-watered and water-stressed conditions. Thus E40M59-5 could be used in marker assisted selection programmes in sunflower. Also E31M50-1 marker was common between PA and SA under well-watered condition in greenhouse. Overlapping QTLs for PA and SA were reported by Burke et al. (2005). Several common markers for OA and LA were found in each environment. This can be explained by correlation between OA and LA as well as by a specific gene of $\Delta 12$ -desaturase which converts oleic acid into linoleic acid in grains and modifies fatty acids composition, as reported in sunflower and soybean (Garcés et al., 1989; Heppard et al., 1996). E37M48-8 and E37M50-6 were also common in two environments for OA and LA. E37M50-6 was a specific marker for water-stress while E37M48-8 was non-specific for well-watered and water-stressed conditions. Markers associated with different traits in both water treatments could be used for marker-assisted selection in both environments. Other markers, which are specific for one water treatment but associated with different traits or specific for a trait, could be useful for a given water treatment.

REFERENCES

- Al-Chaarani, G., L. Gentzbittel, G. Barrault, S. Lenoble, and A. Sarrafi. 2004. The effect of gamma rays and genotypes on sunflower organogenesis traits. *J. Genet. Breed.* 58:73.
- Burke, J.M., S.J. Knapp, and L.H. Rieseberg. 2005. Genetic consequences of selection during the evolution of cultivated sunflower. *Genetics* 171:1933-1940.
- Fernández- Martínez, J.M., J. Osorio, M. Mancha, and R. Garcés. 1997. Isolation of high palmitic mutants on high oleic background. *Euphytica* 97:113-116.
- Fernández- Moya, V., E. Martínez-Force, and R. Garcés. 2002. Temperature effect on a high stearic acid sunflower mutant. *Phytochem.* 59:33-38
- Fulton, T.M., J. Chungwongse, and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and herbaceous plants. *Plant Mol. Biol.* 13:207-209.
- Garcés, R., J.M. García, and M. Mancha. 1989. Lipid characterization in seeds of a high oleic acid sunflower mutant. *Phytochem.* 28:2597-2600.
- Heppard, E.P., A.J. Kinney, K.L. Stecca, and G.H. Miao. 1996. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiol.* 110:311-319.
- Ivanov, P., D. Petakov, V. Nikolova, and E. Petchev. 1988. Sunflower breeding for high palmitic acid content in the oil. p. 463-465. In: *Proc. 12th Int. Sunfl. Conf.*, Novi Sad, Yugoslavia. Int. Sunfl. Assoc., Toowoomba, Australia.
- Mahmood, T., M. Rahman, G. Stringam, F. Yeh, and A. Good. 2006. Identification of quantitative trait loci (QTL) for oil and protein contents and their relationships with other seed quality traits in *Brassica juncea*. *Theor. Appl. Genet.* 113:1211-1220.
- Osorio, J., J.M. Fernández-Martínez, M. Mancha, and R. Garcés. 1995. Mutant sunflower with high concentration in saturated fatty acid in the oil. *Crop Sci.* 35:739-742.
- Soldatov, K.I. 1976. Chemical mutagenesis in sunflower breeding. p. 352-357. In: *Proc. 7th International Sunfl. Conference*, Krasnodar, USSR. Int. Sunfl. Assoc., Vlaardingen, The Netherlands.
- Sarrafi, A., H. Kayyal, G. Rachid Al-Chaarani, F. Cantin, A.S. Chaline, and E. Durielle. 2000. Inheritance of organogenesis parameter in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *J. Genet. Breed* 54:227-231.
- Vijayan, K., P.P. Srivatsava, C.V. Nair, A.K. Awasthi, A. Tikader, B. Sreenivasa, and S.R. Urs. 2006. Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant Breed.* 125:298-301.

5.2. Synthèse des résultats et conclusion

5.2.1. Variabilité génétique des paramètres de germination et de la qualité de la graine

L'analyse de variance effectuée chez 30 lignées de mutants et la lignée originelle (AS613) révèle un effet significatif du traitement hydrique (avec ou sans PEG dans le milieu de culture) sur les paramètres de la germination. Une variation génétique significative a été observée sur cette population de mutants pour les caractères relatifs à la vitesse et au taux de germination. L'analyse révèle également une interaction significative entre le traitement hydrique et les génotypes, suggérant que la réponse à la contrainte hydrique diffère selon les génotypes (Article 4, Tableau 2-page 124). La différence entre la meilleure lignée de la population de mutants et la lignée originale (AS613) est significative pour le pourcentage de germination (PSG) et la durée de germination (TMG) sous contrainte hydrique. Le mutant « *M6-39 -2 -1* » a montré un pourcentage de germination plus élevé que la lignée « AS613 » sous contrainte hydrique (80% vs 70%). Cette lignée « *M6-39 -2 -1* » présente également un pourcentage de germination élevé en l'absence de contrainte hydrique. Cette lignée pourrait être utilisée dans des programmes d'amélioration pour la tolérance à la sécheresse (Article 4, Tableau 3-page 125). Une corrélation significative négative a été observée entre le poids de 1000 graines (1000GW) et le pourcentage de germination (PSG) en condition sèche. Une telle corrélation a été également rapportée par Singh et al. (1978) chez le soja et Torres et al. (1991) chez le tournesol.

Une variabilité génétique significative a été observée au sein de cette population de mutants pour les caractères de qualité de l'huile. Ce résultat souligne l'efficacité de l'irradiation aux rayons gamma pour induire des variations génétiques pour les caractères de qualité de la graine chez le tournesol (Article 5). Parmi les mutants étudiés, certains présentent un intérêt particulier (gain génétique significatif) par rapport à la lignée 'AS613'. Par exemple, le mutant « *M6-826-2* » présente des teneurs en acides stéarique et oléique plus élevées que la lignée « AS613 », et ceci dans les différents environnements (serres et champ) et dans toutes les conditions (irriguée et non irriguée) (Article 5, Tableau 1-page 129). Cette lignée a également montré une valeur significativement différente en comparaison avec « AS613 »

pour la vitesse de germination (Article 4, Tableau 3-page 125). Une autre lignée « *M6-862-INI* » de cette population présente une forte teneur en l'huile dans les différentes conditions de cultures (serre et champ). Ce mutant pourrait être utilisé dans des programmes d'amélioration pour la tolérance à la sécheresse avec une valeur intéressante de teneur en huile.

5.2.2. Identification de marqueurs moléculaires associés aux caractères étudiés

Les résultats de l'identification de marqueurs AFLP pour les différents caractères de la germination ont montré que le nombre de marqueurs varie de 3 à 9 selon le caractère et les traitements hydriques. Parmi les marqueurs identifiés certains sont communs aux différents traitements hydriques et d'autres sont spécifiques à un traitement donné. Par exemple, les marqueurs « *E37M62-5* » et « *E33M60-6* » ont été identifiés pour le pourcentage de germination (PSG) sous contrainte hydrique et pour la durée de germination (TSG et T50%G) dans la condition témoin (Article 4, Tableau 5-page 127). Parmi les huit marqueurs détectés pour le temps de début de germination (TSG), deux (*E37M50-8*, *E33M50-10*) sont communs avec le temps de fin de germination (TMG). Nous avons identifié un important marqueur « *E31M62-10* » lié à PSG qui est également lié aux TSG et T50%G en condition témoin. Ce marqueur explique 23% de la variance phénotypique pour le pourcentage de germination en condition normale.

En ce qui concerne les caractères de qualité de l'huile, le marqueur « *E40M59-5* » est associé à la teneur en huile dans toutes les conditions (irriguée et stress hydrique) en serre et au champ. Ce marqueur « *E40M59-5* » est également associé à la teneur en protéines (PC) et à la composition en acides gras (PA et SA) dans différentes conditions. Cet exemple de marqueur, commun à plusieurs caractères, confirme les corrélations observées entre ces caractères de qualité de la graine (Article 5, Tableau 2-page 130). Nous avons détecté un autre marqueur « *E37M48-8* » qui est commun à différents caractères de qualité de l'huile (OA et LA) dans toutes les conditions hydriques et les environnements expérimentaux (serre et champ).

Les marqueurs AFLP liés aux paramètres de germination et de qualité de la graine pourraient être utilisés dans le cadre de la sélection assistée par marqueurs (SAM). Dans ce cadre les marqueurs associés à un caractère dans différents environnements présentent un intérêt particulier. Par conséquent, les marqueurs *E40M59-5* et *E37M48-8*, détectés pour la qualité d'huile et stables dans les différentes conditions étudiées, pourraient être employés dans des

programmes de sélection (Article 5, Tableau 2 page 130).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif premier de ce travail était d'évaluer les effets du stress hydrique sur la variabilité génétique de caractères associés à la germination et à la qualité des graines chez le tournesol. Le 2^{ème} objectif était d'identifier les régions génomiques contrôlant ces caractères en conditions normales et de déficit hydrique. Dans ce cadre, deux populations de tournesol (100 lignées recombinantes et 30 mutants) ont été étudiées sous différents traitements hydriques et dans différents environnements (serre et champ, et milieu contrôlé pour le test de germination).

6.1. Variabilité génétique des caractères de germination et de la qualité des graines chez le tournesol

Les résultats montrent qu'il existe une variabilité génotypique pour les paramètres associés à la germination sous contrainte hydrique au sein de la population de lignées recombinantes. La lignée parentale PAC2 a montré certains avantages significatifs concernant la durée et le pourcentage de germination en condition de sécheresse par rapport au parent RHA266, alors que ces deux mêmes parents ne présentaient pas de différences de germination en condition témoin. Un gain génétique significatif a été observé pour le pourcentage de germination sous contrainte hydrique. Ce phénomène pourrait être dû à l'accumulation des allèles favorables venant des deux lignées parentales chez les lignées recombinantes sélectionnées. La contrainte hydrique augmente la durée de la germination et diminue le pourcentage final de germination; ces résultats confirment ceux obtenus par Young et al. (1983), Lafond et Beker, (1986), Bradford, (1990) et Battaglia (1997) chez le blé. Il a été observé une forte corrélation entre le pourcentage de germination en condition de contrainte hydrique et en condition témoin. De tels résultats ont également été observés par Foolad et Lin (1999) et Foolad et al. (1999) chez la tomate. Nous pouvons également noter que les génotypes LR16, C62, C89, C101 et C115 présentent un fort pourcentage de germination en condition de contrainte hydrique ainsi qu'en condition témoin.

L'analyse de l'effet du déficit hydrique sur la qualité de l'huile (composition en acides gras) et sur la qualité de la graine (teneur en protéines et poids de la graine) montre qu'il existe des différences de réponses des génotypes à la contrainte hydrique. Une différence significative a

été notée entre les deux parents PAC2 et RHA266 pour les teneurs en acides oléique et linoléique mais également pour le poids de 1000 graines en serre en condition de stress hydrique. Le génotype RHA266 présente des valeurs plus élevées pour le poids de 1000 graines et la teneur en acide oléique par comparaison avec le parent PAC2. En revanche, PAC2 a montré une plus grande richesse de l'huile et en acide linoléique par rapport à RHA266. D'une manière générale, on remarque dans notre étude que la teneur en protéines des graines augmente en réponse au déficit hydrique chez les RILs confirmant ainsi les résultats de Ozturk et Aydin (2004) obtenus chez le blé. Par ailleurs, une forte ségrégation transgressive a été observée pour les caractères de qualité (teneurs en huile et en protéines, composition en acides gras, poids de 1000 graines et densité de la graine) des LIRs. La ségrégation transgressive serait le résultat de l'accumulation d'allèles positifs venant des deux lignées parentales. Ce phénomène pourrait être dû à la nature polygénique de ces caractères de qualité de la graine.

La population de mutants présente également une variabilité génétique significative pour tous les caractères étudiés. De plus, l'effet du traitement hydrique a été significatif pour les paramètres de germination, ainsi que pour la teneur en acide stéarique (en serre et au champ) et les teneurs en protéines et en huile en serre. Le gain génétique significatif pour la plupart des caractères étudiés chez les mutants montre l'efficacité de l'irradiation aux rayons gamma pour induire une variation génétique au niveau des caractères de qualité de la graine chez le tournesol. La lignée M6-826-2 a montré les meilleures valeurs pour les teneurs en acides stéarique et oléique mais aussi pour les temps de début et de 50% de la germination en condition normale. Cette lignée mutante pourrait être utilisée dans des programmes d'amélioration des plantes grâce à ses caractères de qualité.

6.2. Les régions chromosomiques d'intérêt pour la germination et la qualité de la graine du tournesol

La forte variabilité génétique observée pour les caractères de qualité des graines nous a conduit à identifier les régions génomiques impliquées dans cette variabilité génétique pour des conditions de cultures différenciées au niveau hydrique. En effet, l'amélioration de la tolérance à la sécheresse nécessite l'identification des QTLs contrôlant ces caractères de qualité en conditions sèches et le transfert des allèles d'intérêt aux cultivars productifs. Dans ce cadre, le développement des outils de marquage moléculaire permet de rechercher des

relations entre la présence de marqueurs et les caractères de qualité. Les cartes génétiques facilitent ainsi l'identification des zones génomiques contrôlant les caractères de qualité.

6.2.1. Comparaison des QTLs identifiés avec ceux présentés dans la littérature

Dans l'ensemble de nos trois études, nous avons identifié dix QTLs co-localisés avec des QTL déjà identifiés dans la littérature. Ces QTLs, utiles au développement de programmes de sélection pour les caractères de qualité chez tournesol, sont présentés ci-après.

Le marqueur SSR « *SSL33* » lié au temps de début de germination (*1.TSG.14.1*) dans notre étude (Article 1, Tableau 3) a été également rapporté par Al-Chaarani et al. (2005) pour la longueur de l'hypocotyle. Cette co-localisation suggère l'existence d'une relation entre le temps de début de germination et la croissance de l'hypocotyle.

Nous avons détecté un marqueur AFLP « *E37M61_6* » lié au pourcentage de germination (Article 1, Tableau 3) qui a été rapporté pour le pourcentage de plantules «normales» par Al-Chaarani et al. (2005). Les allèles à effets positifs pour les deux QTLs viennent du parent RHA-266. Ce phénomène confirme la corrélation fortement significative entre le pourcentage de germination et le pourcentage de plantules «normales».

Le marqueur SSR « *ORS243* » est lié avec un QTL contrôlant la teneur en acide palmitique (*4.PA.8.2*) en condition de contrainte hydrique au champ (Article 2, Tableau 5). Ce marqueur SSR (*ORS243*) est lié avec le gène « *Es3* » sur le groupe de liaison 8 chez le tournesol (Pérez-Vich et al. 2006). « *Es3* » détermine un phénotype très élevé en acide stéarique chez le tournesol. De plus, « *Es3* » a un effet pléiotropique sur les teneurs des d'autres acides gras de l'huile de tournesol (Pérez-Vich et al. 2006). Ce QTL « *4.PA.8.2* » identifié dans notre étude est probablement sous la dépendance du gène « *Es3* ».

Une co-localisation de QTLs contrôlant les teneurs en acides oléique et linoléique sur le groupe de liaison 4 a été associée au marqueur SSR « *ORS337* ». Ce marqueur a été également identifié par Tang et al. (2006) pour la teneur en huile. Il est possible que cette région chromosomique contienne le gène de la $\Delta 12$ -desaturase, responsable de la conversion de l'acide oléique en acide linoléique dans les graines chez le tournesol (Garcés et al. 1989).

Le marqueur SSR « *ORS407* » liée à la teneur en protéines (Article 3, Tableau 3) a été

également rapporté par Tang et al. (2006) pour la teneur en huile et le poids des amandes. L'effet opposé de cette zone chromosomique sur les deux caractères contribue à expliquer la liaison négative entre la teneur en huile et en protéines.

Le QTL « 4.SD.16.1 » pour la densité de graine, lié au marqueur SSR « ORS899 » sur le groupe de liaison 16, co-localise avec un QTL pour le potentiel osmotique à pleine turgescence identifié par Poormohammad Kiani et al. (2007). Ce QTL impliqué dans la régulation de l'état hydrique (potentiel osmotique à pleine turgescence) pourrait avoir un effet indirect sur la croissance de la coque (conditionne le volume de la graine) et le remplissage (poids de la graine) des graines.

Nous avons identifié un QTL « 3.SD.4.1 » contrôlant la densité de la graine dans des conditions non limitantes en eau qui a été également rapporté pour le potentiel osmotique dans ces mêmes conditions par Poormohammad Kiani et al. (2007). Les allèles favorables pour ces deux QTLs ne proviennent pas du même parent. Cette région chromosomique liée au potentiel osmotique a un effet sur le volume de la graine et en conséquence influence la densité de la graine.

De plus un QTL (4.SD.12.1) contrôlant la densité de la graine sous contrainte hydrique est co-localisé avec un QTL pour l'ajustement osmotique en stress hydrique (Poormohammad Kiani et al. 2007). Les allèles favorables pour les deux QTLs viennent du parent RHA266.

Sur le groupe de liaison 17, le QTL « 1.TGW.17.4 » contrôlant le poids de 1000 graines est lié au marqueur SSR ORS677. Ce marqueur a également été rapporté par Tang et al. (2006) pour être lié au poids du péricarpe. Le QTLs « 1.TGW.14.1 » pour le poids de 1000 graines, localisé sur le groupe de liaison 14, a également été identifié par Tang et al. (2006) pour ce même caractère.

6.2.2. *QTLs communs à différents paramètres de qualité de la graine*

L'identification de QTLs influençant plusieurs caractères simultanément pourrait augmenter l'efficacité de la sélection assistée par marqueurs (SAM) et ainsi augmenter le progrès génétique (Upadyayula et al. 2006). Pour répondre à cet objectif, nous avons comparé les positions des QTLs contrôlant la germination avec celles des QTLs des caractères de qualité de la graine (teneur en huile et protéines, composition en acides gras). Nous avons identifié

plusieurs QTLs communs à nos différentes études. Ces co-localisations de QTLs aident à mieux comprendre les bases génétiques des caractères étudiés et éventuellement à développer plus rapidement des génotypes d'intérêt.

Nous avons identifié un QTL contrôlant le pourcentage de germination dans les deux conditions hydriques, co-localisé avec un QTLs associé à la teneur en protéines des graines. Ces QTLs sont liés au marqueur SSR « *ORS671_1* » sur le groupe de liaison 4. Cette co-localisation suggère le rôle important des protéines pour la germination dans les différentes conditions hydriques. Une autre co-localisation a été identifiée pour les QTLs relatifs au pourcentage de germination (2. *PSG .17.3*) sous contrainte hydrique et au poids de 1000 graines (1.*TGW.17.4*). Cette co-localisation est située sur le groupe de liaison 17 (marqueur *ORS677*) et les allèles favorables viennent des différentes lignées parentales. Ce résultat confirme la corrélation négative entre la germination sous contrainte hydrique et le poids des graines. La quantité d'eau nécessaire pour la germination étant plus élevée pour les graines ayant une masse importante. Le marqueur SSR « *ORS297* » sur le groupe de liaison 17 est lié à deux QTLs associés au pourcentage de germination en sécheresse et à la teneur en acide linoléique. Les allèles favorables pour ces QTLs viennent de la même lignée parentale (RHA266). Trois autres QTLs contrôlant la germination en condition sèche (2. *PSG .17.1*, 2. *PSG .17.2* et 2. *PSG .17.3*) sont co-localisés sur ce groupe de liaison 17.

Plusieurs QTLs contrôlant les temps références de la germination sont co-localisés avec ceux contrôlant la teneur en huile et la composition en acides gras. Ces QTLs communs confirment les corrélations entre la teneur en huile et vitesse de germination. Le marqueur SSR « *HA3886* » sur le groupe de liaison 14 est lié à la fois au temps de germination sous contrainte hydrique et à la teneur en acide stéarique de la graine. Les allèles favorables pour les deux QTLs identifiés viennent de RHA266.

Nous avons détecté quatre régions chromosomiques sur les groupes de liaison 1, 8, 10 et 16, où les QTLs contrôlant la teneur en protéines ont été co-localisés avec des QTLs de teneur en huile. Un marqueur SSR « *ORS407* » sur le groupe de liaison 16 est lié à ces QTLs (teneur en huile et protéines). De même, chez le soja, Lee et al. (1996) ont identifié des marqueurs en communs sur cinq groupes de liaisons, qui ont été associés à la teneur en huile et protéines.

Les cinq QTLs contrôlant teneurs en protéines (1.%P.12.1 et 2.%P.12.1) et en acide stéarique

(1.SA.12.1, 2.SA.12.2 et 4.SA.12.1) sont tous situés dans la même position, sur le groupe de liaison 12. Cette région est liée à un marqueur SSR «ORS671_2». De plus, les allèles favorables pour tous les QTLs viennent du même parent (PAC2). Cette co-localisation de QTLs sur le groupe de liaison 12 pourrait être due à l'existence d'une base génétique commune pour ces caractères ou bien à un effet pléiotropique pour les caractères étudiés. On observe également ce phénomène sur d'autres groupes de liaisons, notamment sur le groupe de liaisons 14.

Plusieurs QTLs contrôlant le poids des graines, amandes et coques sont co-localisés avec des QTLs de teneurs en huile et en acides gras, ainsi qu'avec des QTLs de la teneur en protéines. Par exemple, le marqueur SSR «ORS657» lié au poids de 1000 coques est aussi lié aux teneurs en huile et en acide stéarique en condition sèche. Nous avons noté que les allèles favorables pour le poids de la coque viennent de PAC2 alors que les allèles favorables pour les teneurs en huile et en acide stéarique viennent de RHA266. Cette région apparaît importante pour ces caractères et le marqueur SSR «ORS657» pourrait être utile dans des programmes de sélection assistés par marqueurs pour choisir des lignées tolérantes à la sécheresse. Nous pouvons également noter des co-localisations pour des QTLs contrôlant la densité de la graine et la composition en acides gras.

Un intérêt majeur de l'identification des QTLs est d'analyser les associations entre les différents caractères notamment en conditions de stress hydrique (Tuberosa et al. 2002). Nous pouvons noter des co-localisations de QTLs contrôlant des caractères de qualité de la graine (poids de la graine) et des caractères de qualité d'huile. Un tel résultat pourrait s'expliquer par des effets pléiotropiques des gènes (QTLs) ou par des loci étroitement liés.

Nous avons étudié les bases génétiques de l'association entre différents caractères par l'analyse de co-localisation des QTLs. Cette étude nous a permis d'identifier des QTLs constitutifs (communs aux différents environnements) et adaptatifs (spécifiques aux différents environnements) pour un grand nombre de caractères impliqués dans l'élaboration de la qualité chez le tournesol. L'identification des régions génomiques liées aux paramètres de germination et également à la qualité de la graine chez les lignées soumises à une contrainte hydrique, sera utile au développement de programmes de sélection pour la tolérance à la sécheresse chez le tournesol.

6.2.3. Marqueurs communs aux mutants et RILs pour les caractères étudiés

Nous avons comparé les marqueurs d'AFLP associés à la germination et la qualité des graines chez les lignées recombinantes avec ceux associés à ces mêmes caractères chez les mutants. Les résultats montrent que trois marqueurs AFLP liés à ces caractères sont communs aux deux populations étudiées (LIRs et mutants). Le plus important d'entre eux est le marqueur « *E33M60-6* » qui est lié à la fois au temps de 50% de germination en condition normale chez les mutants et à la composition en acides gras sous contrainte hydrique chez RILs. Ce phénomène confirme des bases génétiques communes pour les caractéristiques de la germination et la composition des graines chez le tournesol. Le marqueur d'AFLP « *E33M50-3* », est lié au temps maximum de germination en stress hydrique chez les mutants et au poids de 1000 graines sur le groupe de liaison 17 chez RILs. Ce marqueur serait intéressant pour contrôler la germination dans des environnements secs.

Le dernier marqueur d'AFLP est « *E33M60-7* » lié au temps maximum de germination en stress hydrique chez les mutants et la teneur en protéines sur le groupe de liaison 7 chez RILs. Ce résultat indique un rôle important de protéines pour la germination sous contrainte hydrique et suggère une base génétique commune pour ces caractères.

Ces marqueurs d'AFLP pourraient être employés dans des programmes de sélection pour améliorer la qualité germinative des graines de tournesol dans des environnements contraints par l'eau, mais également pour améliorer la qualité des graines du tournesol soumis à la sécheresse.

6.3. Perspectives

Concernant les perspectives de nos études, plusieurs axes de recherches seraient envisageables. Ce travail pourrait être développé par l'étude du profil de tocophérols dans le but d'augmenter le degré de stabilité oxydative de l'huile de tournesol. L'activité anti-oxydante des tocophérols protège les acides gras en éliminant les radicaux libres. D'ailleurs, chez le tournesol, il a été montré une corrélation positive entre le C18:2 et l' α -tocophérol (Kamal-Eldin et Andersson, 1997). Une analyse génétique des tocophérols pourrait compléter nos travaux concernant la qualité de la graine du tournesol.

Afin d'identifier précisément les zones du génome impliquées dans l'expression des caractères de germinations et de la qualité des graines, il serait envisageable de réaliser des croisements entre les RILs présentant un polymorphisme dans l'intervalle de la zone étudiée. Après recombinaison génétique, il devrait être possible d'identifier des génotypes présentant des recombinaisons dans cette zone et d'évaluer ces génotypes, pour identifier les marqueurs étroitement liés au caractère étudié.

Nous avons décomposé les caractères quantitatifs en composantes mendéliennes (QTLs) pour mieux comprendre l'architecture génétique des caractères étudiés au sein du génome. A moyen terme, l'utilisation de cette information et son intégration dans les programmes de sélection assistée par marqueurs pourrait entraîner des gains génétiques importants (Ribaut et Ragot, 2007). Cependant, la sélection assistée par marqueurs reste encore très controversée. La stabilité de l'expression des 'QTLs' selon le milieu (Ribaut et Ragot, 2007), vis-à-vis du fond génétique (Charcosset et al. 1993), à travers les générations et selon le stade de développement (Bradshaw et Stettler, 1995) sont autant d'aspects qui pourraient ralentir l'utilisation des marqueurs identifiés en sélection. Afin de vérifier la stabilité des zones du génome impliquées dans l'expression des caractères liés à la qualité, il serait nécessaire de réaliser des expérimentations complémentaires dans différents environnements pédoclimatiques et dans d'autres fonds génétiques, ce qui permettrait de valider les QTLs constitutifs et les QTLs spécifiques aux environnements.

Analyser l'expression d'un grand nombre de gènes à l'aide de technique microarray peut aider à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de la qualité de la graine du tournesol. Cette technique peut être déployée selon deux objectifs : 1- analyser l'expression de gènes en utilisant les génotypes contrastés et corrélérer le niveau d'expression des gènes aux différences phénotypiques relatives aux caractères de qualité de la graine. 2- analyser l'expression des gènes sur toutes les lignées recombinantes (RILs) issues du croisement 'PAC-2' × 'RHA-266' pour identifier les QTL contrôlant l'expression de gène (eQTL). Cette dernière approche permettrait de localiser les QTLs impliqués dans l'expression différentielle globale des gènes et, par conséquent, d'associer la variation phénotypique avec la variation transcriptomique. L'analyse du transcriptome par puce à ADN peut fournir des informations quantitatives sur plusieurs dizaines de milliers de gènes simultanément (Alizadeh et al. 2000).

Enfin, la base de données issue de nos expérimentations pour la germination et la qualité des

graines pourrait être utilisée pour introduire de nouveaux paramètres génétiques dans le modèle de culture ‘Tournesol’ (développé actuellement dans l’ UMR). Ainsi, la combinaison de la génétique quantitative (QTL) et de tels modèles de cultures devrait permettre de prévoir quels allèles seraient favorables pour des scénarios de sécheresse variés (Reymond et al. 2003 ; Hammer et al. 2005).

REFERENCES

7. Références

- Ahmad, S., 2001: Environmental effect on seed characteristics of sunflower (*Helianthus annuus* L.). J. Agron. Crop Sci. 187: 213-216.
- Al-Chaarani, G.R, Roustae, L., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Barrault, G., Dechamp-Guillaume, G., and Sarrafi, A. 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). Theor. Appl. Genet. 104: 490–496.
- Al-Chaarani, G.R., Gentzbittel, L. Wedzony, M. and Sarrafi, A. 2005. Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Science 16: 221-227.
- Al-Chaarani, G.R., Gentzbittel, L., Huang, X.Q., and Sarrafi, A. 2004a. Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theor. Appl. Genet. 109: 1353–1360.
- Al-Charrani, G., Gentzbittel, L., Barrault, G., Lenoble, S., and Sarrafi, A., 2004b. The effect of gamma rays and genotypes on sunflower organogenesis traits. J. Genet. Breed. 58: 73.
- Alejo-James, A., Jardinaud, M.F., Maury, P., Aliber, J., Gentzbittel, L., Sarrafi, A., Grieu, P. and Petitprez, M. 2004. Genetic variation for germination and physiological traits in sunflower mutants induced by gamma rays. J. Genet. Breed. 58: 285-294.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma C Lossons, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T. and Yu, X. 2000 Distinc type of diffuse large B-Cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 403: 503- 511.
- Alonso, L.C. 1988 . Estudio genetico del character alto oleico en el girasol y su comportamiento a distinas temperaturas. In Proc. 12th international sunflower conference., Novi Sad, Yugoslavia. p 454-462.
- Ascherio, A., and Willett, W.C. 1997. Health effects of *trans* fatty acids. Am. J. Clin. Nutr. 66: 1006S–1010S.

- Ayerdi Gotor, A., Farkas, E., Berger, M., Labalette, F., Centis, S., Dayde', J., and Calmon, A. 2007. Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109: 525–530.
- Baldini, M., Giovanardi, R., and Vannozzi, G. 2000. Effects of different water availability on fatty acid composition of the oil in standard and high oleic sunflower hybrids. *In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France, I A*, 79-84.
- Baldini, M., Giovanardi, R., Tahmasebi-Enferadi, S., and Vannozzi, G.P. 2002. Effects of water regime on fatty acid accumulation and final fatty acid composition in the oil of standard and high oleic sunflower hybrids. *Ital. J. Agron.* 16: 119–126.
- Baldini, M., Vannozzi, G.P., Bervillé, A., and Tersac, M. 1999. Yield relationships under drought in sunflower genotypes obtained from a wild population and cultivated sunflowers in rain-out shelter in large pots and field experiments. *Helia*, 22: 81-96.
- Basten, C.J., Weir, B.S. and Zeng, Z.B. 2001. QTL Cartographer, Version 1.15 Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Battaglia, M. 1997. Seed germination model for *Eucalyptus delegatensis* provenances germinating under conditions of variable temperature and water potential.
- Bau, H.M., Mohtadi-Nia, D.J., Mejean, L., and Debry, G. 1983. Preparation of colorless sunflower protein products: effect of processing on physicochemical and nutritional properties. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 60: 1141-1148.
- Beavis, W.D. 1994. The power and deceit of QTL experiments: lessons from comparative studies. *In : Proc. of the 49th Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference, Chicago, 7–8 December 1994. Edited by D. Wilkinson. American Seed Trade Association, Washington. pp. 250–266.*
- Bedov, S. 1985. A study of combining ability for oil and protein contents in seed of different sunflower inbreds. *In Proc. 10th Int. Sunflower Conf. Mar del Plata, Argentina. 10-13 Mar. 1985. Int. Sunflower assoc. Paris, France. p 675-682.*
- Ben-Chaim, A., Grube, R.C., Lapido, M., Jahn, M., Paran, I. 2001. Identification of quantitative

- trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *capsicum annuum*. Theor. Appl. Genet. 102: 1213-1220.
- Berot, S. and Briffaud, J. 1983. Parameters for obtaining concentrates from rapeseed and sunflower meal. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 33: 237-242.
- Berry, S.T., Leon, A.J., Hanfrey, C.C., Challis, P., Burkolz, A., Barnes, S.R., Rufener, G.K., Lee, M. and Caligari, P.D.S. 1995. Molecular-marker analysis of *Helianthus annuus* L. 2. Construction of an RFLP map for cultivated sunflower. Theor. Appl. Genet. 91: 195-199
- Bert, P.F., Jouan, I., Tourvielle de Labrouhe, D., Serre, F., Nicolas, P., and Vear, F. 2002. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. Theor. Appl. Genet. 105: 985-993.
- Betty, M., Finch-savage, W.E. King, G.J. and Lynn, J.R. 2000. Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in *Brassica oleracea*. *New Phytol.* 148: 277-286.
- Bewley, J.D. and Black, M. 1978. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Berlin: Springer-verlag. p 306.
- Bewley, J.D. and Black, M. 1994. Seeds-physiology of development and germination, 2nd edn. New York: plenum press. p 445.
- Blanchet R., 1987. Principaux caractères agronomiques et physiologiques déterminant la production des graines de tournesol. *Revue Française des Corps Gras*, 2: 75-80.
- Blanchet, R. 1989. Physiologie agronomique du tournesol. Rapports d'activité, *INRA* station
- Blanchet, R. and Merrien, A. 1982. Influence of water supply on assimilation, yield components and oil-protein production of sunflower. *In: Proc. Sunflower workshop, ECC plant protein programme, Athens, Greece*, 185-201.
- Blanchet, R., Piquemal, M., Cavalie, G., Hernandez, M., and Quinones, H. 1988. Influence de contraintes hydriques sur la répartition des assimilats entre les organes du tournesol. *In: Proc. XII International Sunflower Conference, Novi-Sad, Yugoslavia*, 124-129.

- Blanchet, R., Texier, V., Gelfi, N., and Rollier, M. 1990. Articulation des divers processus d'adaptation à la sécheresse et comportements globaux du tournesol. *In: Proc. Le tournesol et l'eau: adaptation à la sécheresse, réponse à l'irrigation*, Points Science du CETIOM, Paris, p.32-44.
- Bohuon, E.J.R., Ramsay, L.D., Craft, J.A., Arthur, A.E., Marshall, D.F., Lydiate, D.J. and Kearsey, M.J. 1998. The association of flowering time quantitative trait loci with duplicated regions and candidate loci in *Brassica nopolis*. *Genetics*, 150: 393- 401.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Dvies, R.W. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, p. 314–331.
- Bradford, K. J. 1995. Water relations in seed germination. In: J. Kigel, and G. Galili, (eds), *Seed development and germination*, 351-396. New York.
- Bradford, K.J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Hort Science*, 21: 1105-1112.
- Bradford, K.J. 1990. A water relations analysis of seed germination rates. *Plant Physiology* 94: 840-849.
- Bradshaw, H.D. and Stettler, R.F. 1995. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form and phenology traits in a forest tree. *Genetics*, 139: 963-973.
- Burke, J.M., Gardner, K.A. and Rieseberg, L.H. 2002. The potential for gene flow between cultivated and wild sunflower (*Helianthus annuus*) in the United States. *Am. J. Bot.* 89: 1550-1552.
- Burke, J.M., Knapp, S.J., and Rieseberg, L.H. 2005. Genetic consequences of selection during the evolution of cultivated sunflower. *Genetics*, 171: 1933–1940.
- Caboche, M., Dubreusqu, B., Grappin, P., Lepinice, L. and Nesi, N. 1998. La germination vient en dormant. *Biofutur* 175: 32- 35.
- Cantisano, S., Martínez-Force, E., and Garce's, R. 2000. Enzymatic studies of high stearic acid sunflower seed mutants. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 377–382.

- Cardon, P. V. 1922. SUNFLOWER STUDIES. Amer. Soc. Agron. Jour. 14: 69-72.
- Castiglioni, P., Ajmone-Marsan, P., van Wijk, R., and Motto, M., 1999. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. Theor. Appl. Genet. 99: 425-431.
- Charcosset, A., Causse, M. and Santoni, S. 1993. Influence du fond génétique sur l'expression de QTLs de précocité chez le maïs. Méribel, Groupe de travail Marqueurs Moléculaires chez les végétaux. 98-109.
- Chenesseau A.C., Piquemal M., Borderies G., Merrien A., et Cavalie G., 1984. Transferts des photosynthétats chez le tournesol. *In*: Proc. XI International Sunflower Conference, Mar Del Plata, Argentina, 51-56.
- Ching, T.M. 1972. Metabolism of germinating seeds. *In*: Kozlowski, T. T., ed. Seed biology-germination control, metabolism, and pathology. Vol.II, New York. Academic Press 103-218.
- Côme, D. and Corbineau, F. 1998. Semences et germination. *In*: Proc. Physiologie végétale II: Croissance et développement, ed.Hermann and P.Mazliak, p. 185-313.
- Conference, Memphis, USA, 123-126.
- Connor, D., and Hall, A.J. 1997. Sunflower physiology. *In*: Proc. Sunflower Technology and Production, *Edited by* A.A. Schneiter. American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America, Madison. pp. 113–182.
- Connor, D.J. and Jones, T.R., 1985. Response of sunflower to strategies of irrigation II. Morphological and physiological responses to water stress. Field Crops Research, 12: 91-103.
- Cook, R.E., 1979: Patterns of juvenile morbidity and recruitment in plants. *In*: O. T. Solbrig, S. Jain, G. B. Johnson, and P. H. Raven (eds.), Topics in Plant Population Biology, 207-301. Columbia University Press, Los Angeles..
- d'agronomie.Castanet-Tolosan 31326: 21-26.
- Dahal, P. and Bradford, K.J. 1990. Effects of priming and endosperm integrity on seed germination rates of tomato genotypes. II. Germination at reduced water potential. Journal of Experimental

Botany, 41: 1441-1453.

De Vienne, D., Causse, M. 1998. La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs. In: Proc. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Edit INRA, p. 200.

Demir Kaya, M., Okçu, G., Atak, M., Şenkılı, Y. and Kolsarıcı, Ö. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Europ. J. Agronomy, 24: 291–295.

Dwivedi, S.L., Nigam, S.N., Rao, R.C.N., Singh, U., and Rao, K.V.S. 1996. Effect of drought on oil, fatty acids and protein contents of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. Field Crops Res. 48: 125–133.

Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Poormohammad Kiani, S., Nabipour, A., Shariati, F., Grieu, P., and Sarrafi, A. 2008a. QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. Genome, 51: 599–615.

Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Shariati, F., Grieu, P., Sarrafi, A. 2008c. Genetic improvement of oil quality in sunflower mutants under water stressed conditions. In *Proceedings of the 17th International Sunflower Conference*. Cordoba, Spain. June 8 –12, 2008. Edited by Velasco, L. p. 509-512.

Ecker, R., Barzilay, A. and Osherenko, E. 1994. The genetic relations between length of time to germination and seed dormancy in lisianthus (*Eustomia grandiflorum*). Euphytica 80: 125-128.

El Asri, M., Essahat, A., Bouniols, A., and Mondières, M. 2000. Rendement et qualité des graines du tournesol cultivé sous contrainte hydrique. Résultats des essais en coopération au Maroc et dans le Sud-Ouest de la France. In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France, I C, 127-132.

Encheva, J., Christov, M., Nenov, N., Tsvetkova, F., Ivanov, P., Shindrova, P. and Encheva, V., 2003. Developing genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by combined use of hybridization with gamma radiation or ultrasound. Helia, 26: 99-108.

- Evans, C.E., and Etherington, J.R. 1990. The effect of soil water potential on seed germination of some British plants. *New Phytol.* 115: 539-548.
- Fehr, W.R., and Weber, C.R. 1968. Mass selection by seed size and specific gravity in soybean populations. *Crop Sci.* 8: 551-554.
- Felde, T.Z., Becker, H.C., and Möllers, C. 2006. Genotype x Environment Interactions, Heritability, and Trait Correlations of Sinapate Ester Content in Winter Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Crop Sci.* 46: 2195-2199.
- Fernandez-Martinez, J.M., Jimenez, A., Dominguez, J., Garcia, J.M., Garces, R., and Mancha, M. 1989. Genetic analysis of the high oleic acid content in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, 41: 39-51.
- Fernandez-Martinez, J.M., Mancha, M., Osorio, J., and Garces, R. 1997. Sunflower mutant containing high levels of palmitic acid in high oleic background. *Euphytica*, 97: 113-116.
- Fernandez-Moya, V., Martinez-Force, E., and Garces, R. 2002. Temperature effect on a high stearic acid sunflower mutant. *Phytochemistry*, 59: 33-37.
- Feussner, I., Hause, B., Nellen, A., Wasternack, C. and Kindl, H. 1996. Lipid-body lipxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipxygenase forms. *Planta* 198: 288-293.
- Fick, G.N. 1975. Heritability of oil content in sunflower. *Crop Sci.* 15: 77-78.
- Fick, G.N. 1978. Sunflower breeding and genetics. In: Carter JF (ed) *Sunflower science and technology*. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin. Pp 279-327
- Fick, G.N. 1984. Inheritance of high oleic acid in the seed oil of sunflower. *In: Proc. Of Sunflower Research Workshop*, Bismarck, N. Dak., 1 February 1984. National Sunflower Association, Bismarck, N. Dak. p. 9.
- Flagella, Z., Rotunno, T., Di Caterin, R., De Simone, G., Ciciretti L., and De Caro, A. 2000. Effect of supplementary irrigation on seed yield and oil quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown in a sub-arid environment. *In: Proc. XV International Sunflower Conference*, Toulouse, France, I C, 139-144.

- Flagella, Z., Rotunno, T., Tarantino, E., Di Caterina, R., and De Caro, A. 2002. Changes in seed yield and oil fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and the water regime. *Eur. J. Agron.* 17: 221–230.
- Flores Berrios, E., Gentzbittel, L., Kayyal, H., Alibert, G., and Sarrafi, A. 2000a. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 1299–1306.
- Flores Berrios, E., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Alibert, G., and Sarrafi, A. 2000b. Genetic control of early events in protoplast division and regeneration pathways in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 101: 606–612.
- Flores Berrios, E., Sarrafi, A., Fabre, F., Alibert, G., and Gentzbittel, L. 2000c. Genotypic variation and chromosomal location of QTLs for somatic embryogenesis revealed by epidermal layers culture of recombinant inbred lines in the sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101:1307-1312.
- Foolad, M.R. 1999. Genetics of salt tolerance and cold tolerance in tomato: Quantitative analysis and QTL mapping. *Plant Biotechnol.* 16: 55-64.
- Foolad, M.R., and Lin, G.Y. 1999. Relationships between cold and salt-tolerance during seed germination in tomato: Germplasm evaluation. *Plant Breeding* 118: 45-48.
- Foolad, M.R., and Jones, R.A 1991. Genetic analysis of salt tolerance during germination in *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 81: 321-326.
- Foolad, M.R., Chen, F.Q. and Lin, G.Y. 1998. RFLP mapping of QTLs conferring salt tolerance during germination in an interspecific cross of tomato. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1133-1144.
- Foolad, M.R., Lin, G.Y. and Chen, F.Q. 1999. Comparison of QTLs for seed germination under non-stress, cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breeding* 118: 167-173.
- Foolad, M.R., Zhang, L. P. and Subbiah, P. 2003. Genetics of drought tolerance during seed germination in tomato: inheritance and QTL mapping. *Genome*, 46: 536-545.
- Fulton, T.M., J. Chungwognse, and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and herbaceous plants. *Plant Mol. Biol.* 13: 207-209.

- Garcés, R., Alvarez-Ortega, R., Cantisan, S., and Martinez-Force E. 2000. Biochemical control of high palmitic acid biosynthesis. *In*: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France, I A, 7-12.
- Garcés, R., Garcí'a, J.M., and Mancha, M. 1989. Lipid characterization in seeds of a high oleic acid sunflower mutant. *Phytochemistry*, 28: 2597–2600.
- Gentzbittel, L., Vear, F., Zhang, Y-X, Bervillé, A. and Nicolas, P. 1995. Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 90: 1079–1086.
- Giriraj, K., Hiremath, S.R. and Seetharam, A. 1990. Induced variability for flowering, seed weight and oil content in parental lines of sunflower hybrid BSH-1. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 50: 1-7.
- Goffner, D., Cazalis, R., Percie du Sert, C., Calmes, J., and Cavalie, G. 1988. 14C photoassimilate partitioning in developing sunflower seeds. *Journal of Experimental Botany*, 39 : 1411-1420.
- Guégen, J. 1998. Protéines d'oléagineux: développer des utilisations non-alimentaires. *Oléoscope*, 44: 18-21.
- Gül, M.K. 2002. QTL-Kartierung und Analyse von QTL x Stickstoff Interaktionen beim Winterraps (*Brassica napus* L.). Ph.D. thesis. Universitaet Göttingen, Germany, pp. 34-38.
- Gül, M.K., Becker, H.C., and Ecke, W. 2003. QTL mapping and analysis of QTL x nitrogen interactions for protein and oil contents in *Brassica napus* L. *In* Proceedings of the 11th Int. Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark, 6 July 2003. pp. 91-93.
- Gupta, A., 1976. Differential effects of irradiation on ornamental varieties of *Helianthus annuus* L. with special reference to their cytological behavior. *Agron. Lusit.* 37: 189-205.
- Gupta, K.K. and Khanna, K.R. 1982. Gene action and heterosis for oil yield and component characters in sunflower. *Indian Journal of Genetic and Plant Breeding* 42: 265-271.
- Gupta, P.K., Roy, J.K. and Prasad, M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants [Review]. *Curr. Sci.* 80: 524–535.

- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C., Ramesh, B. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed.* 118: 369–390.
- Haanstra, J.P.W., Wye, C., Verbakel, H., Meijer-Dekens, F., Van den Berg, P., Odinet, P., van Heusden, A.W., Tanksley, S., Lindhout, P. and Peleman, J. 1999. An integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii* F2 populations. *Theor Appl Genet* 99: 254-271.
- Haley, C.S. and Knott, S.A. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, 69: 315–324.
- Hall A.J., Chimenti C.A., Vilella F. And Freier G., 1985. Timing of water stress effects on yield components of sunflower. *In: XI International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina*, 131-136.
- Hall, A.J., Whitfield, D.M., and Connor, D.J. 1990. Contribution of pre-anthesis assimilates to grainfilling in irrigated and water-stressed sunflower crops II. Estimates from a carbon budget. *Field Crops Research*, 24: 273-294.
- Hammer, G., Chapman, S., van Oosterom, E. and Podlich, D. 2005. Trait physiology and crop modelling as a framework to link phenotypic complexity to underlying genetic systems. *AJAR*. 56: 947-960.
- Harris, H.C., McWilliam, J.R., and Mason, W.K. 1978. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 1203-1212.
- Hartwig, E.E., and Collins, F.I. 1962. Evaluations of density classification as a selection technique in breeding soybeans for protein or oil. *Crop Sci.* 2: 159–162.
- Harwood, J.L. 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1301: 7–56.
- Hatzopoulos, P., Franz, G., Choy, L., and Sung, R.Z. 1990. Interaction of nuclear factors with upstream sequences of lipid body membranes protein gene from carrot. *Plant Cell*, 2: 457-467.
- Hegarty, T.W. 1978. The physiology of seed hydration and dehydration, and the relation between water stress and the control of germination: a review. *Plant Cell. and Environment* 1: 101-

- Heppard, E.P., A.J. Kinney, K.L. Stecca, and G.H. Miao. 1996. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiol.* 110:311-319.
- Heydecker, W., Higgins, J. Turner, Y.J. 1975. Invigouration of seeds. *Seed Science and Technology* 3: 881-888.
- Hongtrakul, V., Slabaugh, M.B., and Knapp, S.J. 1998. A seed specific D-12 oleate desaturase gene is duplicated, rearranged, and weakly expressed in high oleic acid sunflower lines. *Crop Sci.* 38: 1245–1249.
- Ivanov, P., Petakov, D., Nikolova, V. and Petchev, E. 1988. Sunflower breeding for high palmitic acid content in the oil. *In: Proc. 12th Int. Sunflower Conf., Novi Sad, Yugoslavia. Int. Sunflower Assoc., Toowoomba, Australia.* pp. 463-465.
- Jahromi, P.H. 1996. Genetic studies on salty tolerance in barley (*Hordeum vulgare L.*), PhD Thesis, The University of Reading, UK.
- Jambhulkar, S.J. and Joshua, D.C. 1999. Induction of plant injury, chimera, chlorophyll and morphological mutations in sunflower using gamma rays. *Helia*, 22: 63-73.
- Jan, C.C., Vick, B.A., Miller, J.F., Kahler, A.L., and Butler, E.T. 1998. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 96: 15-22.
- Jeuken, M., Van Wijk, R., Peleman, J. and Lindhout, P. 2001. An integrated interspecific AFLP map of lettuce (*Lactuca*) based on two *L. sativa* x *L. saligna* F2 populations. *Theor. Appl. Genet.* 103: 638-647.
- Jones, R.A. 1986. High salt-tolerance potential in *Lycopersicon* species during germination. *Euphytica* 35: 576-582.
- Kamal-Eldin A. and Andersson R. 1997. A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 74: 375-380.

- Kassem, A.M., Meksem, K., Wood, A.J., and Lightfoot, D.A. 2007. A microsatellite map developed from late maturity germplasm 'Essex' by 'Forrest' detects four QTL for soybean seed yield expected from early maturing germplasm. *Rev. Biol. Biotech.* 6: 11–19.
- Kearsey, M.J. 1998. The principals of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany*, 49: 1619-1623.
- Kearsey, M.J. and Hyne, V. 1994. QTL analysis: a simple 'marker-regression' approach. *Theor. Appl. Genet.* 89: 698–702.
- Knapp, S.J., Bridges, W.C. and Birkes, D. 1990. Mapping QTL using molecular marker linkage maps. *Theor. Appl. Genet.* 79: 583-592.
- Kris-Etherton, P.M., and Yu, S. 1997. Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 1628S–1644S.
- Lacombe, S. and Bervillé, A. 2000a . Analysis of desaturase transcript accumulation in normal and in high oleic oil sunflower development seeds. In *Proc. 15th international sunflower conference*, 12- 15 june 2000, 1 : A-1.
- Lacombe, S. and Bervillé, A. 2000b. A dominant mutation for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed oil genetically linked to a single oleate- desaturase RFLP locus. *Molecular Breeding*, 0: 1-9.
- Lacombe, S., and Berville, A. 2001. A dominant mutation for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed oil is genetically linked to a single oleate-desaturase RFLP locus. *Mol. Breed.* 8: 129–137.
- Lacombe, S., Guillot, H., Kaan, F., Millet, C. and Bervillé, A. 2000. Genetic and molecular characterisation of the high oleic content of sunflower oil in pervents. In *Proc. 15th international sunflower conference*. 12- 15 june 2000, 1 : A-13.
- Lafond, G.P. and Baker, R.J. 1986. Effect of temperature, moisture stress, and seed size on germination of nine spring wheat cultivars. *Crop Sci.* 26: 563-567.
- Lai, Z., Livingstone, K., Zou, Y., Church, S.A., Knapp, S.J., Andrews, J. and Rieseberg, L.H. 2005. Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower. *Theor Appl Genet* 1118: 1532–

- Laisney J., 1984. L'huilerie moderne. Ed.Masson, 79-86.
- Lander, E.S. and Botstein, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121: 185-199.
- Langridge, P., Lagudah, E.S., Holton, T.A., Appels, R., Sharp, P.J. and Chalmers, K.J. 2001. Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 52: 1043–1077.
- Leclercq, P. 1969. Une stérilité male cytoplasmic chez le tournesol. *Annales de l'amélioration des plantes*, 19: 99-106.
- Leclercq, P. 1970. Sunflower hybrids using male sterility. *In: Proc. IV International Sunflower*
- Lee, S.H., Bailey, M.A., Mian, M. A.R., Carter, T.E. Jr, Shipe, E.R., Ashley, D.A, Parrot, W.A., Hussey, R.S., and Boerma, H.R. 1996. RFLP loci associated with soybean seed protein and oil content across populations and locations. *Theor. Appl. Genet.* 93: 649–657.
- Lenzi, A., Fambrini, M. Barotti, S. Pugliesi, C.and Vernieri, P.1995. Seed germination and seedling growth in a wilty mutant of sunflower (*Helianthus annuus L.*): effect of abscisic acid and osmotic potential. *Environmental and Experimental Botany* 35:427-434.
- Leon A.J., Lee, M., Rufener, G.K., Berry, S.T., and Mowers, R.P. 1995. Use of RFLP markers for genetic linkage of oil percentage in sunflower seed (*Helianthus annuus*). *Crop Science*, 35: 558- 564.
- Leon, A.J., Andradeb, F.H., and Lee, M. 2003. Genetic analysis of seed-oil concentration across generations and environments in sunflower. *Crop Sci.* 43: 135–140.
- Leon, A.J., Lee, M., and Andrade, F.H. 2001. Quantitative trait loci for growing degree days to flowering and photoperiod response in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Theor. Appl. Genet.* 102: 497–503.
- Lin, Y., and Huang, A.H.C. 1983. Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 225: 360-369.

- Liu, J., Zhu, J.K. 1998. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280: 1943–1945.
- MacKeon, T.A. and Stumpf, P.K. 1982. Purification and characterisation of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-protein thioesterase from mature seeds of sunflower. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 257: 12141-12147.
- Mackill, D.J., Zhang, Z., Redona, E.D. and Colowit, P.M. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39: 969-977.
- Mahmood, T., M. Rahman, G. Stringam, F. Yeh, and A. Good. 2006. Identification of quantitative trait loci (QTL) for oil and protein contents and their relationships with other seed quality traits in *Brassica juncea*. *Theor. Appl. Genet.* 113:1211-1220.
- Manly, K.F., Olson, J.M. 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Man Genome* 10: 327-334
- Markel, P.D., Fulker, D.W., Benett, B., Corley, R.P. and De Fries, J.C. 1996. Quantitative trait loci for ethanol sensitivity in the LS×SS recombinant inbred strain: interval mapping. *Behav. Genet.* 26: 447-458.
- Martinez-Rivas, J.M., Sperling, P., Lu's, W., and Heinz, E. 2001. Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (*FAD2*) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Mol. Breed.* 8: 159–168.
- Maury, P., Berger, M., Mojayad, F. and Planchon, C. 2000. Leaf water characteristics and drought acclimation in sunflower genotypes. *Plant Soil.* 223: 153–160.
- May, C., Preisig-Müller, R. Höne, M. Gnau, P. and Kindl, H. 1998. A phospholipase A2 is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1393: 267-276.
- Mekki, B.B., El-Kholy, M.A., and Mohammed, E.M. 1999. Yield, oil and fatty acids contents as affected by water deficit and potassium fertilization in two sunflower cultivars. *Egyptian Journal of Agronomy*, 21: 67-85.
- Merrien, A. 1992. Les points techniques du CETIOM: physiologie du tournesol. Ed. CETIOM, 66p.

- Merrien, A., Blanchet, R., and Gelfi, N. 1981. Importance of senescence resistance and leaf survival in yield formation in sunflower under water stress. *Informations Techniques CETIOM*, 77: 12-16.
- Merrien, A., Blanchet, R., and Gelfi, N. 1983. Effect of source-sink relationships and of intraspecific competition on changes in net assimilation during the development cycle of sunflower. *Agronomie*, 3: 1045-1051.
- Mestries, E., Gentzbittel, L., Tourvieille de Labrouhe, D., Nicolas, P., and Vear, F. 1998. Analysis of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Mol. Breed.* 4: 215–226.
- Miller, J.F. and Vick, B. 2001. Registration of four high linoleic sunflower germplasms. *Crop Science*, 27: 923-926.
- Miller, J.F., Zimmerman, D.C., and Vick, B.A. 1987. Genetic control of high oleic acid content in sunflower oil. *Crop Sci.* 27: 923–926.
- Mokrani, L., Gentzbittel, L., Azanza, F., Fitamant, L., Al-Chaarani, G., and Sarrafi, A. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 149–156.
- Morin, A. 2003. Le tournesol oléique: une production innovante. *Oléoscope*, 70: 21-23.
- Morizet, J., and Merrien, A. 1990. Principaux traits du comportement hydrique du tournesol. In *Le tournesol et l'eau* (eds. R. Blanchet & A. Merrien), pp.7–21. Cetiom Pub., Paris.
- Muriel, J.L., and Downes, R.W. 1974. Effects of periods of moisture stress during various phases of growth of sunflower in the greenhouse. In : *Proceedings of the 6th International Sunflower Conference, Bucharest, Romania, 22–24 July 1974. Edited by A.V. Vranceanu.* ISA Bucharest, Romania. pp. 127–131.
- Murphy, D.J. 1994. *Designer oil crops: breeding, processing and biotechnology.* VCH Weinheim, New York.
- Nel, A.A., Loubser, H.L., and Hammes, P.S. 2002. Development and validation of relationships between sunflower seed quality and easily measurable seed characteristics for grading

- purposes. S. Afr. J. Plant Soil, 19: 201–205.
- Osario, J., Fernandez-Martinez, J., Mancha, M. and Garces, R. 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Science*, 35: 739-742.
- Ozturk, A., and Aydin, F. 2004. Effect of water stress at various growth stages on some quality characteristics of winter wheat. *J. Agron. Crop Sci.* 190: 93-99.
- Pankovic, D., Sakac, Z., Kevresan, S. and Plesnicar, M. 1999. Acclimation to longterm water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *J. Exp. Bot.* 330: 127–138.
- Perez-Vich B., Garces R., et Fernandez-Martinez J.M., 2000a. Genetic characterization of sunflower mutant with high content of saturated fatty acids in seed oil. *Helia*, 23, 77-84.
- Perez-Vich B., Garces R., et Fernandez-Martinez J.M., 2000b. Genetic relationships between loci controlling the high stearic and the high oleic acid traits in sunflower. *Crop Science*, 40, 990-995.
- Pérez-Vich, B., Ferná'ndez-Martí'nez, J.M., Grondona, M., Knapp, S.J., and Berry, S.T. 2002b. Stearoyl-ACP and oleoyl-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying high stearic and high oleic acid mutant phenotypes in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 104: 338–349.
- Pérez-Vich, B., Garcés, R., and Ferná'ndez-Martí'nez, J.M. 2002a. Inheritance of high palmitic acid content in the sunflower mutant CAS-12 and its relationship with high oleic content. *Plant Breed.* 121: 49–56.
- Pérez-Vich, B., Knapp, S.J., Leon, A.J., Ferná'ndez-Martí'nez, J.M., and Berry, S.T. 2004b. Mapping minor QTL for increased stearic acid content in sunflower seed oil. *Mol. Breed.* 13: 313–322.
- Pérez-Vich, B., Leon, A.J., Grondona, M., Velasco, L., and Ferná'ndez-Martí'nez, J.M. 2006. Molecular analysis of the high stearic acid content in sunflower mutant CAS-14. *Theor. Appl. Genet.* 112: 867–875.
- Pérez-Vich, B., Munöz-Ruz, J., and Fernandez-Martinez, J.M. 2004a. Developing midstearic acid

- sunflower lines from a high stearic acid mutant. *Crop Sci.* 44: 70–75.
- Perez-Vich, B., Velasco, L., and Fernandez-Martinez, J.M. 1998. Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 75: 547-555.
- Piva, G., Bouniols, A., and Mondières, M. 2000. Effect of cultural conditions on yield, oil content and fatty acid composition of sunflower kernel. *In: XV International Sunflower Conference*, Toulouse, France, I A: 61-66.
- Pleite, R., Martí'nez-Force, E., and Garcés, R. 2006. Increase of the stearic acid content in high-oleic sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9383–9388.
- Poormohammad Kiani, S., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A., Nishinakamasu, V., Hopp, E., Gentzbittel, L., Paniego, N., and Sarrafi, A. 2007. Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci.* 172: 773–787.
- Preston, K. R. and Kruger, J. E. 1986. Mobilization of protein reserves during germination. *In* MJ Dalling, ed, *Plant Proteolytic Enzymes*, Vol 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-18
- Pustovoit, V.S. 1964. Conclusions of working on the selection and seed production of sunflower (in Russian). *Agrobiology* 5:662–697.
- Rafalski, J.A. 2002a. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches [Review]. *Plant Sci.* 162: 329–333.
- Rafalski, J.A. 2002b. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics [Review]. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 94–100.
- Reymond, M., Muller, B., Leonardi, A., Charcosset, A., Tardieu, F. 2003. Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyse the genetic variability of the responses of leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiol.* 131: 664-675.
- Ribaut, J.M. and Ragot, M. 2007. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *J. Exp. Bot.* 58: 351-360.

- Roberts, E. H., and Ellis, R. H. 1989. Water and seed survival. *Annals of Botany* 63: 39-52.
- Robles-S, R. and Lopez-S, E., 1977. Efecto de las irradiaciones gamma 60Co de 10 a 25 krad a la semilla de girasol (*Helianthus annuus* L.) variedad Tecmon-1. Monterrey, Invest. Inst. Technol. Estud. Super., Div. Cienc. Agropec. Maritimas. pp.58-60. (Informe, 15).
- Roche, J., Bouniols, A., Mouloungui, Z., Barranco, T., and Cerny, M. 2006. Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108: 287–297.
- Sadeghipour, H. R., and Bhatla, S. C. 2002. Differential sensitivity of oleosins to proteolysis during oil body mobilization in sunflower seedlings. *Plant Cell Physiol.* 43: 1117-1126.
- Saleki, R., Young, P.G. and Lefebvre, D.D. 1993. Mutants of *Arabidopsis thaliana* Capable of Germination under Saline Conditions. *Plant Physiol.* 101: 839-845.
- Santoni, S., Faivre-Rampant, P., Prado, E., Prat, D. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cah. Agric.* 9: 3311–3327.
- Santonoceto, C., Anastasi, U., Riggi, E., and Abbate, V. 2003. Accumulation dynamics of dry matter and major fatty acids in sunflower seeds in relation to genotypes and water regimes. *Italian Journal of Agronomy*, 7: 3-14.
- Sarrafi, A., H. Kayyal, G. Rachid Al-Chaarani, F. Cantin, A.S. Chaline, and E. Durielle. 2000. Inheritance of organogenesis parameter in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *J. Genet. Breed* 54: 227-231.
- SAS Institute Inc. 1996. SAS/STAT user's guide, version 6, 4th ed., Vols. 1 and 2. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Schilling, E.E. and Heiser, C.B. 1981. Infrageneric classification of *Helianthus* (Compositae) *Taxon*, 30: 393-403.
- Schmidt, L., Marquard, R. and Friedt, W. 1989. status and prospects of breeding high oleic acid sunflower for central Europe. *Fat Sci. Tech.* 91: 346-349.
- Schneider, A.A., and Miller, J.F. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* 21: 901–

- Schuppert, G.F., Tang, S., Slabaugh, M.B., and Knapp, S.J. 2006. The sunflower high-oleic mutant *Ol* carries variable tandem repeats of *FAD2-1*, a seed-specific oleoyl-phosphatidyl choline desaturase. *Mol. Breed.* 17: 241–256.
- Seiler, G.J. 1997. Anatomy and morphology of sunflower. In: *Sunflower Technology and Production*. Agron. 35. pp. 67-111. Ed. Schneiter, A.A.
- Singh, C. B., Dalai, M.A. and Singh, S. P. 1978. Genetic Analysis of Field Germination in Soybean. *Theor. Appl. Genet.* 52: 165-169.
- Skoric, D. 1985. Sunflower breeding for resistance to *Diaporthe helianthi/phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. *Helia*, 8: 21-24.
- Skoric, D. 1988. Sunflower breeding. *Uljarstov*, 25: 1-90.
- Slack, C.R., Roughan, P.G. and Brows, J. 1979. Evidence of an oleoyl phosphatidyl choline desaturase in microsomal preparation from cotyledons of sunflower seeds. *Biochem. J.* 649-656.
- Snow, A.A., Moran-Palma, P. Rieseberg, L.H. Wszelaki, A. and Seiler, G.J. 1998. Fecundity, phenology, and seed dormancy of F1 wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, *Asteraceae*). *Amer. J. Bot.* 85: 794-801.
- Soldatov, K.I., 1976. Chemical mutagenesis in sunflower breeding. In: *Proc. 7th International Sunflower Conference*, Krasnodar, USSR. Int. Sunflower Assoc., Vlaardingen, The Netherlands. pp. 352-357.
- Soltner, D. 1995. Les grandes productions végétales. Collection Sciences et Techniques Agricoles.
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J.G., and Ohlrogge, J.B. 2000. Lipids. In *Biochemistry and molecular biology of plants*. Edited by B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R.L. Jones. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md. pp. 456–527.
- Sosulski, F.W. 1979. Food uses of sunflower proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:438–442.

- Specht, J.E., Chase, K., Macrander, M., Graef, G.L., Chung, J., Markwell, J.P., Germann, M., Orf, J.H., and Lark, K.G. 2001. Soybean response to water: A QTL analysis of drought tolerance. *Crop Sci.* 41: 493-509.
- Steer, B.T. and Hocking, P.J. 1984. Nitrogen nutrition of sunflower (*Helianthus annuus* L.): Acquisition and partitioning of dry matter and nitrogen by vegetative organs and their relationship to seed yield. *Field Crops Research*, 9: 237-251.
- Stymne, S. and Appelqvist, L.A. 1980. the biosynthesis of linoleic and linolenic in homogenates from developing soybean cotyledons. *Plant Sci. Lett.* 17: 287-293.
- Sujatha, H.L., Chikkadevaiah and Nandini, R. 2002. Genetic variability study in sunflower inbreds. *Helia*, 37: 93-100.
- Talha, M. and Osman, F. 1974. Effect of soil water stress on water economy and oil composition in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Agricultural Science Camberra*, 84: 49-56.
- Tang, S., Leon, A., Bridges, W.C., and Knapp, S.J. 2006. Quantitative trait loci for genetically correlated seed traits are tightly linked to branching and pericarp pigment loci in sunflower. *Crop Sci.* 46: 721–734.
- Tang, S., Yu, J.K., Slabaugh, M.B., Shintani, D.K., and Knapp, S.J. 2002. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor. Appl. Genet.* 105:1124–1136.
- This, P., Goffner, D., Raynal, M., Chartier, M., and Delseny, M. 1988. Characterization of major storage proteins of sunflower and their accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 26: 125-132.
- Torres, M. G., S. Frutos, and J. M. Duran, 1991. Sunflower seed deterioration from exposure to UV-C radiation. *Environ. Exp. Bot.* 31: 201-207.
- Triboï, E., Martre, P., and Triboï-Blondel, A.M. 2003. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *J. Exp. Bot.* 54: 1731-1742.
- Tuberosa, R. Salvi, S. Sanguineti, M.C. Landi, P. Maccaferri, M. and Conti, S. 2002. Mapping morpho-physiological traits and yield: Case studies, shortcomings and perspectives in

- drought-stressed maize, *Ann. Bot.* 89: 941–963.
- Turhan, H., and Baser, I. 2004. In vitro AND In vivo water stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 27: 227-236.
- Tzen, J.T.C., Lai, Y.K., Chan, K.L., and Huang, A.H.C. 1990. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in oil bodies of diverse seed species. *Plant Physiology*, 94: 1282- 1289.
- Ujjinaiah, U.S., Shauthamallaiiah, N.R. and Murali, W. M. 1989: Effect of different row spacing and N and P2O5 fertilizer levels on growth, yield, yield components and quality of seed in sunflower. *Mysor. J. Agric. Sci.* 23: 146-850.
- Unger, P.W. 1982a. Planting date effects on sunflower head and seed development. *Agronomy Journal*, 74: 389-395.
- Unger, P.W. 1982b. Time and frequency of irrigation effects on sunflower production and water use. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 1072-1076.
- Upadyayula, N., da Silva, H.S., Bohn, M.O., and Rocheford, T.R. 2006. Genetic and QTL analysis of maize tassel and ear inflorescence architecture. *Theor. Appl. Genet.* 112: 592–606.
- Urie, A.L. 1984. Inheritance of very high oleic acid content in sunflower. *In* : Proceedings of Sunflower Research Workshop, Bismarck, N. Dak., 1 February 1984. National Sunflower Association, Bismarck, N. Dak. pp. 8–9.
- Urie, L., 1985. Inheritance of high oleic acid in sunflower. *Crop Science*, 25: 986-989.
- Vance, V.B. and Huang, A.H.C. 1988. Expression of lipid body protein gene during maize seed developement. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 1476-1481.
- Vancreanu, A.V. 1977. The sunflower. ed. Mundi-Prensa, Madrid, Espagne, pp. 86.
- Vear, F. and Tourveille de Labrouhe, D. 1988. Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. II. Study of capitulum resistance to natural and artificial ascospore infections. *Agronomie*, 8: 503-508.

- Vear, F., Bony, H., Joubert, G., Tourveille de Labrouhe, D., Pauchet, I., and Pinochet X. 2003. 30 years of sunflower breeding in France. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 10: 66-73.
- Velasco, L., Pérez-Vich, B. and Fernandez- Martinez, J.M. 2000. Inheritance of oleic acid contents under controlled environment. In Proc. 15th international sunflower conference. 12- 15 June 2000, 1: PL. AS-10.
- Vera-Ruiz, E.M., Velasco, L., Leon, A.J., Fernández-Martnez, J.M. and Pérez-Vich, B. 2006. Molecular tagging and genetic mapping of the *Thp1* gene controlling beta-tocopherol accumulation in sunflower. *Mol. Breeding*. 17: 291-296.
- Vick, B. and Miller J.F. 1996. Utilization of mutagens for fatty acid alteration in sunflower. *In*: Proc. XVIII Sunflower research workshop. National Sunflower Association, Bismark, ND, USA, 11-17.
- Vijayan, K., P.P. Srivatsava, C.V. Nair, A.K. Awasthi, A. Tikader, B. Sreenivasa, and S.R. Urs. 2006. Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant Breed*. 125: 298-301.
- Vijayan, K., Srivatsava, P.P., Nair, C.V., Awasthi, A.K., Tikader, A., Sreenivasa, B. and Urs, S.R. 2006. Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant Breed*. 125: 298- 301.
- Villalobos, F.J., Hall, A.J., Ritchie, J.T., and Osman, F. 1996. Oilcrop-sun : A development, growth, and yield model of the sunflower crop. *Agronomy Journal*, 88: 403-415.
- Vranceanu, A.V. and Stoenescu, F.M. 1982. Achievements and prospects of sunflower genetics, breeding and induced mutation utilization. *In*: IAEA. Improvement of oil seed and industrial crops by induced mutations. Vienna, International Atomic Energy Agency.
- Wang, S. M., and A. H. C. Huang, 1987: Biosynthesis of lipase in the scutellum of maize Kernel. *J. Biol. Chem*. 262: 2270-2274.
- Wang, S., Basten, C.J., and Zeng, Z.B. 2005. Windows QTL Cartographer V2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, N.C.. Available from <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>.

- Wang, Y.H., Thomas, C.E., and Dean, R.A. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 791-798.
- Whittington, W.J. 1973. Genetic regulation of germination, in: W. Heydecker (Ed.), *Seed Ecology*, Butterworths, London, UK, pp. 0–5.
- Wilson, K.A. 1986. Role of proteolytic enzymes in the mobilization of protein reserves in the germinating dicot seed. *In* MJ Dalling, ed, *Plant Proteolytic Enzymes*, Vol 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1948
- Yoneyama, T., Arai, K., and Totsuka, T. 1980. Transfer of radioactive carbon after the application of ^{14}C alanine and $^{14}\text{CO}_2$ to sunflower leaves. *Plant Cell Physiology*, 21: 1367-1381.
- Young, J.A., Evans, R.A., Roundy, B., and Cluff, G. 1983. Moisture stress and seed germination .USDA, science and Education Administration Publication ARM W-36.
- Yu, J.K., Tang, S., Slabaugh, M.B., Heesacker, A., Cole, G., Herring, M., Soper, J., Han, F., Chu, W.C., Webb, D.M., Thompson, L., Edwards, K.J., Berry, S., Leon, A., Olungu, C., Maes, N., and Knapp, S.J. 2003. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Sci.* 43: 367–387.
- Zeng, Z. B., 1993: Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 10972–10976.
- Zeng, Z. B., 1994: Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457–1468.
- Zhao, J.Y., Becker, H.C., Zhang, D.Q., Zhang, Y.F., and Ecke, W. 2006. Conditional QTL mapping of oil content in rapeseed with respect to protein content and traits related to plant development and grain yield. *Theor. Appl. Genet.*, 113: 33-38.
- Zimmerman, D.C. 1962. The relationship between seed density and oil content in flax. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 39: 77-78.

Titre: Contrôle génétique de la qualité des graines chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.) soumis à la sécheresse

Résumé: Afin de progresser dans la compréhension des caractères impliqués dans la qualité des graines du tournesol en condition de contrainte hydrique, nous avons réalisé plusieurs expérimentations, sur deux populations de tournesol exprimant diverses sources de variabilité génétique : des lignées recombinantes (RILs) et des mutants.

Dans une première partie, la variabilité génétique pour des paramètres de qualité germinative des graines en conditions normale et de contrainte hydrique a été étudiée chez les RILs. Nous avons détecté 6 QTLs stables dans les deux conditions expérimentales pour les paramètres de germination. Ces QTLs peuvent être utilisés dans les programmes de sélection visant à améliorer la germination du tournesol. Une co-localisation importante sur le groupe de liaison 11 a été détectée pour les temps de référence de la germination. Nous avons noté que tous les allèles favorables viennent de la lignée RHA266. Ce génotype pourrait être utilisé dans les programmes d'hybridations afin d'améliorer la vitesse de germination chez cette espèce.

La deuxième partie consiste en l'étude de la qualité nutritive des graines chez les RILs et leurs parents, cultivées en serre et au champ, et dans des conditions irriguées et de déficit hydrique. Les régions génomiques contrôlant la teneur en l'huile, la composition en acides gras (palmitique, stéarique, oléique et linoléique), la richesse des graines en protéines ainsi que la grosseur des graines ont été identifiées. Nous avons détecté plusieurs co-localisations de QTLs pour les caractères étudiés ; ces QTLs pourraient être utilisés pour la sélection assistée par marqueurs chez le tournesol. Un QTL majeur pour la teneur en acide oléique, sur le groupe de liaison 3, est co-localisé avec les QTLs contrôlant plusieurs caractères de qualité de l'huile.

La troisième partie est consacrée à l'étude des marqueurs moléculaires associés aux paramètres de la qualité des graines chez une population de mutants (M6). Parmi les mutants étudiés, certains présentent un gain génétique significatif par rapport à la lignée originelle pour les différents paramètres de qualité analysés. Nous avons également comparé les marqueurs en commun chez les mutants et les LIRs pour les caractères étudiés.

Mots clés : déficit hydrique, qualité des graines, QTL, tournesol, gain génétique, germination